illumina®

Guía del sistema NextSeq® 500

Para uso exclusivo en investigación.
Prohibido su uso en procedimientos de diagnóstico.

PROPIEDAD DE ILLUMINA
N.º de referencia 15046563 Rev. I ESP
Mayo de 2015

N.º de catálogo SY-415-9001DOC

Personalice una guía de flujo de trabajo integral con la herramienta de selección de protocolos personalizados
support.illumina.com/custom-protocol-selector.html

Este documento y su contenido son propiedad de Illumina, Inc. y sus afiliados ("Illumina"), y están previstos solamente para el uso contractual de sus clientes en conexión con el uso de los productos descritos en él y no para ningún otro fin. Este documento y su contenido no se utilizarán ni distribuirán con ningún otro fin ni tampoco se comunicarán, divulgarán ni reproducirán en ninguna otra forma sin el consentimiento previo por escrito de Illumina. Illumina no transfiere mediante este documento ninguna licencia bajo sus derechos de patente, marca comercial, copyright ni derechos de autor ni similares derechos de terceros.

Para garantizar el uso correcto y seguro de los productos aquí descritos, el personal cualificado y adecuadamente capacitado debe seguir sus instrucciones de manera rigurosa y expresa. Se debe leer y entender completamente todo el contenido de este documento antes de usar estos productos.

SI NO SE LEEN COMPLETAMENTE NI SE SIGUEN EXPRESAMENTE TODAS LAS INSTRUCCIONES AQUÍ CONTENIDAS, PODRÍAN PRODUCIRSE DAÑOS EN EL PRODUCTO, LESIONES EN PERSONAS (USUARIOS U OTROS) Y DAÑOS EN OTRA PROPIEDAD.

ILLUMINA NO ASUME RESPONSABILIDAD ALGUNA DERIVADA DEL USO INCORRECTO DEL SOFTWARE Y DE LOS PRODUCTOS AQUÍ DESCRITOS (INCLUIDAS LAS PIEZAS Y EL SOFTWARE).

© 2015 Illumina, Inc. Todos los derechos reservados.

Illumina, **24sure**, **BaseSpace**, **BeadArray**, **BlueFish**, **BlueFuse**, **BlueGnome**, **cBot**, **CSPro**, **CytoChip**, **DesignStudio**, **Epicentre**, **GAIIx**, **Genetic Energy**, **Genome Analyzer**, **GenomeStudio**, **GoldenGate**, **HiScan**, **HiSeq**, **HiSeq X**, **Infinium**, **iScan**, **iSelect**, **MiSeq**, **NeoPrep**, **Nextera**, **NextBio**, **NextSeq**, **Powered by Illumina**, **SeqMonitor**, **SureMDA**, **TruGenome**, **TruSeq**, **TruSight**, **Understand Your Genome**, **UYG**, **VeraCode**, **verifi**, **VeriSeq**, el color naranja calabaza y el diseño de las bases de streaming son marcas comerciales de Illumina, Inc. o de sus filiales en EE. UU. u otros países. Todos los demás nombres, logotipos y marcas comerciales son propiedad de sus respectivos dueños.

Historial de revisiones

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15046563_ESP	I	Mayo de 2015	Corrección de la descripción de los depósitos reservados en el cartucho de reactivos.
15046563	H	Mayo de 2015	Corrección del volumen de Tween 20 en la solución de lavado utilizada para los lavados manuales. Reestructuración de la información sobre las opciones de configuración del sistema. Desplazamiento de la información sobre el software de análisis en tiempo real al Apéndice A.

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15046563	G	Febrero de 2015	Actualización de las descripciones de software de acuerdo con el software de control de NextSeq v1.4: • Incorporación de las opciones de lavado manual: lavado rápido y lavado manual posterior al experimento. • Incorporación de la descripción de las funciones de personalización del experimento para purgar consumibles al final del experimento y omitir la confirmación de la comprobación previa al experimento. • Incorporación de opción para cancelar y reiniciar una comprobación previa al experimento. • Incorporación de opción para habilitar la supervisión del experimento en el modo independiente. • Eliminación de la descripción de los archivos de desplazamientos y de hebra retrasada, que ya no se guardan en la carpeta del experimento. • Actualización de la imagen de diagrama de dispersión para mostrar unas llamadas de bases con una distribución más uniforme al utilizar la versión 1.4 del software del sistema. • Incorporación de descripción del servicio de copia del experimento. • Incorporación de opción para utilizar un cebador de Índice 2 personalizado, posible con el NextSeq 500 Kit v2. Para obtener más información, consulte *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de referencia 15057456)*. Actualización de las instrucciones de preparación de reactivos para su uso con el NextSeq 500 Kit v2: Eliminación de los pasos manuales para la carga de hipoclorito de sodio y de cebadores de doble índice en el cartucho de reactivo. Estos reactivos vienen precargados en el cartucho de reactivo v2. Si desea obtener más información, consulte *Guía de referencia del NextSeq 500/550 Kit v2 (n.º de referencia 15058065)*. Incorporación de la sección de consumibles para secuenciación que enumera las versiones de kit, las versiones de NCS compatibles y el nombre y número de referencia de la guía de referencia del kit correspondiente. Actualización de consumibles proporcionados por el usuario para especificar los usos del NaOCl para las opciones de lavado manual introducidas en el NCS v1.4. Corrección de los requisitos de los grupos que superan el filtro a no más de una llamada de bases por debajo de la castidad en los primeros 25 ciclos. Incorporación de volumen de 120 ml de agua de laboratorio a las instrucciones de comprobación del sistema.

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15046563_ESP	F	Septiembre de 2014	Corrección de las descripciones de las funciones del software de control de NextSeq v1.3. Modificación de la URL de las hojas de datos de seguridad (SDS) a support.illumina.com/sds.html. Cambio de las marcas de producto de NextSeq de ™ a ®.
15046563	E	Agosto de 2014	Actualización de las descripciones del software de acuerdo con el software de control de NextSeq v1.3: • Actualización de las descripciones de los comandos System Customization (Personalización del sistema) y Software Updates (Actualizaciones de software) en la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento). • Actualización de la descripción de la pantalla Pre-Run Check (Comprobación previa al experimento), que agrupa los elementos de comprobación en cuatro categorías ampliables. • Actualización de las instrucciones de Live Help para acceder a Live Help mediante la URL. El icono de la pantalla Home (Inicio) no está disponible en el NCS v1.3. • Incorporación del procedimiento de rehibridación integrado en el instrumento para rehibridar el cebador de Lectura 1. La opción de rehibridar una celda de flujo es compatible con el NCS v1.3, o posterior, y requiere un cartucho de reactivo nuevo y un cartucho de tampones nuevo. Incorporación de *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de referencia 15057456)* a la lista de recursos adicionales.
15046563	D	Junio de 2014	Incorporación de instrucciones para cargar BP13 en la posición n.º 18 del cartucho de reactivo al realizar experimentos de doble índice. Corrección del ciclo en el que aparecen los criterios de medición de densidad de grupos, es decir, el ciclo 25. Corrección de las posiciones del cartucho de reactivo para cebadores personalizados como posición n.º 7 (Lectura 1), n.º 8 (Lectura 2) y n.º 9 (Índice 1). Incorporación de una nota sobre los daños que se pueden producir al cambiar la posición del instrumento tras la instalación. Póngase siempre en contacto con su representante de Illumina antes de cambiar la posición del instrumento. Modificación de la URL de las hojas de datos de seguridad (SDS) a support.illumina.com/sds.ilmn.

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15046563_ESP	C	Abril de 2014	Actualización de las descripciones del software de acuerdo con el software de control de NextSeq v1.2 y RTA v2.1: • Incorporación del nombre de fórmula NextSeq Mid (Medio) para el uso con el kit NextSeq 500 de rendimiento medio. • Eliminación de las instrucciones para añadir NaOCl al cartucho de lavado de tampones para un lavado manual. • Corrección del volumen NaOCl a 3 ml para la posición n.º 28 del cartucho de reactivo, que se requiere para el lavado automático posterior al experimento. • Indicación de que los nombres de experimentos largos aparecen en un campo con barra de desplazamiento de la pantalla Run Setup (Configuración del experimento). • Indicación de que RTA v2 no aplica las correcciones de hebra retrasada y hebra adelantada en las lecturas de índice. • Incorporación de la descripción de los archivos de registro a la lista de archivos utilizada para solucionar problemas. • Incorporación de instrucciones para el vaciado de un contenedor lleno de reactivos usados durante un experimento. • Incorporación de la descripción de las carpetas de fórmulas, incluida la ubicación de las fórmulas personalizadas. • Incorporación de la descripción de comprobaciones térmicas de ventiladores y sondas térmicas.

N.º de referencia	Revisión	Fecha	Descripción del cambio
15046563_ESP	B	Febrero de 2014	Actualización de las descripciones del software de acuerdo con el software de control NextSeq v1.1: • Incorporación de la función de búsqueda en la pantalla Run Setup (Configuración del experimento) para el filtrado de la lista de experimentos disponibles. • Incorporación de NextSeq High (Alto) o NextSeq Mid (Medio) en las fórmulas disponibles en función del tipo de celda de flujo. • Indicación de que las actualizaciones de software incluyen el acuerdo de licencia, las notas de la versión y la lista de actualizaciones de software. • Incorporación de la descripción del mensaje de error de RAID. • Indicación de que el botón Exit (Salir) cierra NSS y reinicia NCS de forma automática al final de una comprobación del sistema. Incorporación del tiempo de almacenamiento de reactivos hasta una semana a 4 °C. Actualización de la etiqueta del cartucho de reactivo para el depósito n.º 10 a Load Library Here (Cargar biblioteca aquí). Actualización de la lista de consumibles proporcionados por el usuario para especificar una solución de hipoclorito de sodio al 3–6 % y un número de catálogo del proveedor. Actualización de las instrucciones para la preparación de una dilución de NaOCl al 0,06 % para lavados del instrumento, que incluye una reducción del volumen a 2 ml y una concentración inicial al 3–6 %. Incorporación de ilustraciones para mostrar la colocación correcta e incorrecta de la pinza en la celda de flujo. Actualización del capítulo relativo al análisis en tiempo real para la inclusión de una descripción general de RTA v2, la estructura de carpetas de resultados y el proceso de llamada de bases. Actualización del capítulo relativo a la solución de problemas para la inclusión de los errores de RTA v2 y la inclusión de RunParameters.xml en la lista de archivos de solución de problemas.
15046563	A	Enero de 2014	Publicación inicial.

Índice

Historial de revisiones iii
Índice ix

Capítulo 1 Primeros pasos 1

Introducción 2
Recursos adicionales 3
Componentes del instrumento 4
Descripción general de consumibles de secuenciación 6
Puesta en servicio del instrumento 9
Software del NextSeq 11
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario 19

Capítulo 2 Secuenciación 21

Introducción 22
Flujo de trabajo de secuenciación 23
Preparación del cartucho de reactivo 24
Preparación de la celda de flujo 25
Preparación de bibliotecas para secuenciación 27
Configuración de un experimento de secuenciación 28
Supervisión del progreso del experimento 34
Lavado automático posterior al experimento 36

Capítulo 3 Mantenimiento 37

Introducción 38
Realización de un lavado manual 39
Actualizaciones de software 42
Apagado del instrumento 44

Capítulo 4 Solución de problemas 45

Introducción 46
Archivos de solución de problemas 47
Live Help 49
Solución de errores de comprobación automática 50
Contenedor de reactivos usados lleno 52
Flujo de trabajo de la rehibridación 53
Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas 55
Comprobación del sistema 56
Mensaje de error de RAID 59

Apéndice A Análisis en tiempo real 61

Introducción 62
Descripción general de RTA v2 63
Flujo de trabajo del análisis en tiempo real 65
Archivos de resultados de secuenciación 68
Placas de la celda de flujo 70
Estructura de carpetas de resultados de secuenciación 73

Índice alfabético 75

Asistencia técnica 79

Primeros pasos

Capítulo 1

Introducción 2
Recursos adicionales 3
Componentes del instrumento 4
Descripción general de consumibles de secuenciación 6
Puesta en servicio del instrumento 9
Software del NextSeq 11
Consumibles y equipos proporcionados por el usuario 19

Introducción

El sistema NextSeq® 500 de Illumina® combina la potencia de la secuenciación de alto rendimiento con la simplicidad de un secuenciador de escritorio.

Características de la

- **Secuenciación de alto rendimiento:** El NextSeq 500 permite realizar secuenciaciones de exomas, genomas completos y transcriptomas, y admite bibliotecas TruSeq® y Nextera®.
- **Tipos de celda de flujo**: Las celdas de flujo están disponibles en configuraciones de rendimiento elevado y medio. Cada tipo de celda de flujo se suministra en un kit con un cartucho de reactivo precargado compatible.
- **Análisis en tiempo real** (RTA, por sus siglas en inglés): El software de análisis integrado realiza un análisis de datos integrado en el instrumento, que incluye análisis de imágenes y llamada de bases. El NextSeq utiliza una nueva implementación de RTA llamada RTA v2, que incluye diferencias importantes en materia de arquitectura y funciones. Para obtener más información, consulte *Análisis en tiempo real* en la página 61.
- **Integración de BaseSpace®:** El flujo de trabajo de secuenciación está integrado en BaseSpace, el entorno informático de genómica del Illumina para colaboración, almacenamiento y análisis de datos. Para los instrumentos configurados para BaseSpace, la información de las bibliotecas y los parámetros del experimento se especifican en la ficha BaseSpace Prep (Preparación de BaseSpace). Los experimentos configurados en BaseSpace aparecen en la interfaz del instrumento durante la configuración del experimento. En el curso del experimento, los archivos de resultados se envían a BaseSpace o BaseSpace Onsite en tiempo real.

Consideraciones de seguridad

Consulte *Guía de cumplimiento y seguridad del sistema NextSeq (n.º de referencia 15046564_ESP)* para obtener información importante acerca de las consideraciones de seguridad.

Recursos adicionales

La documentación siguiente está disponible para su descarga del sitio web de Illumina.

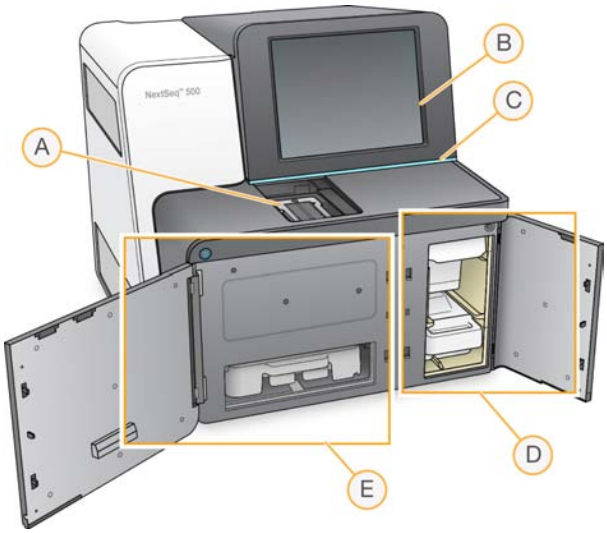
Recurso	Descripción
Guía de preparación del centro para el sistema NextSeq (n.º de referencia 15045113_ESP)	Proporciona especificaciones para el espacio del laboratorio, los requisitos eléctricos y las consideraciones medioambientales.
Guía de cumplimiento y seguridad del sistema NextSeq (n.º de referencia 15046564_ESP)	Proporciona información sobre las consideraciones de seguridad operativa, las declaraciones de cumplimiento y el etiquetado del instrumento.
Guía del usuario del lector de RFID, n.º de modelo TR-001-44 (n.º de referencia 15041950_ESP)	Proporciona información sobre el lector de RFID del instrumento, las certificaciones de conformidad y las consideraciones de seguridad.
Desnaturalización y dilución de las bibliotecas para el sistema NextSeq (n.º de referencia 15048776)	Proporciona instrucciones para la desnaturalización y dilución de bibliotecas preparadas para un experimento de secuenciación, y la preparación de un control PhiX opcional. Este paso se aplica a la mayoría de los tipos de bibliotecas.
Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de referencia 15057456)	Proporciona información sobre el uso de cebadores de secuenciación personalizados en lugar de cebadores de secuenciación de Illumina.
Ayuda de BaseSpace (help.basespace.illumina.com)	Proporciona información sobre el uso de BaseSpace® y las opciones de análisis disponibles.

Visite la página de asistencia del NextSeq 500 del sitio web de Illumina para acceder a la documentación, las descargas de software, la formación en línea y las preguntas frecuentes.

Componentes del instrumento

El sistema NextSeq 500 incluye un monitor con pantalla táctil, una barra de estado y tres compartimentos.

Figura 1 Componentes del instrumento



- A **Compartimento de adquisición de imágenes**: Alberga la celda de flujo durante el experimento de secuenciación.
- B **Monitor con pantalla táctil:** Permite la configuración integrada en el instrumento y la configuración mediante el uso de la interfaz del software de control.
- C **Barra de estado**: Indica el estado del instrumento, es decir, si está en funcionamiento (azul), si requiere asistencia (naranja), si está listo para la secuenciación (verde) o si se debe realizar un lavado en las próximas 24 horas (amarillo).
- D **Compartimento de tampones:** Alberga el cartucho de tampones y el contenedor de reactivos usados.
- E **Compartimento de reactivos:** Alberga el cartucho de reactivo.

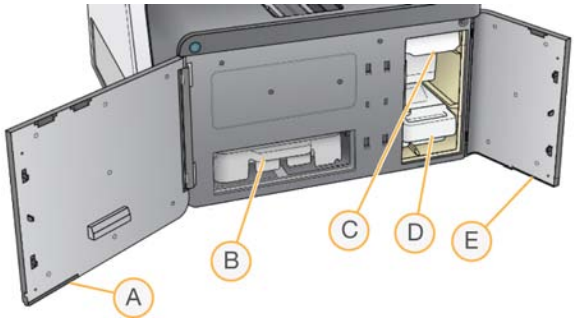
Compartimento de adquisición de imágenes

El compartimento de imágenes aloja la platina, que incluye tres pasadores de alineación para colocar la celda de flujo. Tras cargar la celda de flujo, la puerta del compartimento de adquisición de imágenes se cierra automáticamente y mueve los componentes hasta su posición.

Compartimentos de reactivos y tampones

La configuración de un experimento de secuenciación en el NextSeq 500 requiere acceso al compartimento de reactivos y al compartimento de tampones para la carga de los consumibles del experimento y el vaciado del contenedor de reactivos usados.

Figura 2 Compartimentos de reactivos y tampones



A **Puerta del compartimento de reactivos:** Cierra el compartimento de reactivos con un cierre situado debajo de la esquina inferior derecha de la puerta. El compartimento de reactivos alberga el cartucho de reactivo. Los reactivos se bombearán por los dispensadores, el sistema de fluídica y, a continuación, la celda de flujo.

B **Cartucho de reactivo:** El cartucho de reactivo es un consumible precargado de un solo uso.

C **Cartucho de tampones:** El cartucho de tampones es un consumible precargado de un solo uso.

D **Contenedor de reactivos usados:** Los reactivos usados se recogen para su desecho después de cada experimento.

E **Puerta del compartimento de tampones:** Cierra el compartimento de tampones con un cierre situado debajo de la esquina inferior izquierda de la puerta. El compartimento de tampones contiene el cartucho de tampones y el contenedor de reactivos usados.

Descripción general de consumibles de secuenciación

Para realizar un experimento de secuenciación en NextSeq 500, necesita un NextSeq 500 Kit de un solo uso. Cada kit incluye una celda de flujo y los reactivos necesarios para llevar a cabo un experimento de secuenciación.

Los componentes del kit están marcados con indicadores codificados por colores que indican la compatibilidad entre las celdas de flujo y los cartuchos de reactivo. Utilice siempre un cartucho de reactivo compatible y una celda de flujo. El cartucho de tampones es universal.

La celda de flujo, el cartucho de reactivo y el cartucho de tampón utilizan la identificación por radiofrecuencia (RFID) para ofrecer precisión en la compatibilidad y el seguimiento de los consumibles.

Etiquetado de compatibilidad del kit

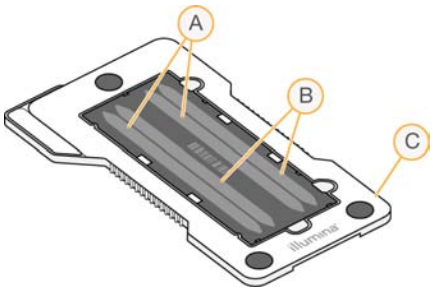
Los componentes del kit están marcados con indicadores codificados por colores que indican la compatibilidad entre las celdas de flujo y los cartuchos de reactivo. Utilice siempre un cartucho de reactivo y una celda de flujo compatible. El cartucho de tampones es universal.

Cada celda de flujo y cartucho de reactivo está etiquetado como **High** (Elevado) o **Mid** (Medio). Revise siempre la etiqueta cuando prepare los consumibles para un experimento.

Tipo de kit	Marca en la etiqueta
Componentes del kit de rendimiento elevado	
Componentes del kit de rendimiento medio	

Descripción general de la celda de flujo

Figura 3 Cartucho de la celda de flujo



A Par de carriles A: carriles 1 y 3
B Par de carriles B: carriles 2 y 4
C Marco del cartucho de la celda de flujo

La celda de flujo es un sustrato elaborado con cristal en el que se generan grupos y se lleva a cabo la reacción de secuenciación. La celda de flujo está revestida por el cartucho de la celda de flujo.

La celda de flujo contiene cuatro carriles y la adquisición de imágenes se realiza de dos en dos.

- Las imágenes de los carriles 1 y 3 (par de carriles A) se adquieren al mismo tiempo.
- Las imágenes de carriles 2 y 4 (par de carriles B) se adquieren tras la adquisición de las imágenes del par de carriles A.

Aunque la celda de flujo tiene cuatro carriles, en la celda de flujo solo se secuencia una sola biblioteca o un conjunto de bibliotecas agrupadas. Las bibliotecas se cargan en el cartucho de reactivo en un único depósito y se transfieren automáticamente a la celda de flujo en los cuatro carriles.

Las imágenes de cada carril se adquieren en áreas de adquisición de imágenes pequeñas denominadas placas. Si desea obtener más información, consulte *Placas de la celda de flujo* en la página 70.

Descripción general del cartucho de reactivo

El cartucho de reactivo es un consumible de un solo uso con etiquetas de seguimiento de identificación por radiofrecuencia (RFID) y depósitos con cierre metálico que está precargado con reactivos de generación de grupos y secuenciación.

Figura 4 Cartucho de reactivo

El cartucho de reactivo incluye un depósito designado para la carga de bibliotecas preparadas. Una vez iniciado el experimento, las bibliotecas se transfieren de forma automática del depósito a la celda de flujo.

Varios depósitos están reservados para el lavado automático posterior al experimento. La solución de lavado se dispensa desde el cartucho de tampones hasta los depósitos reservados, pasando por el sistema, hasta llegar al contenedor de reactivos usados.

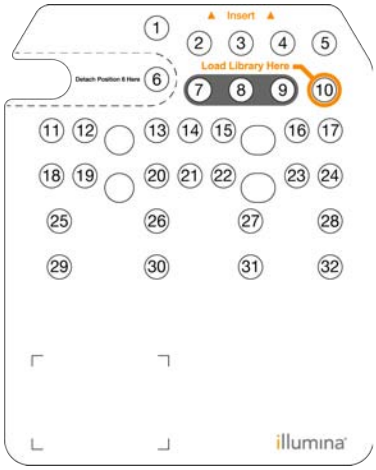
Todos los depósitos del cartucho de reactivo están numerados. No perfore la cobertura metálica salvo que se le solicite para cargar las bibliotecas antes de un experimento, por ejemplo.

ADVERTENCIA

Este grupo de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina que puede alterar la capacidad reproductora. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos puesto que puede provocar lesiones. Utilice equipos de protección, entre ellos, gafas de protección, guantes y bata de laboratorio. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normas de seguridad gubernamentales de su región. Si desea obtener información de seguridad, salud y medio ambiente, consulte la hoja de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.html.

Depósitos reservados

Figura 5 Depósitos numerados



Posición	Descripción
7, 8 y 9	Reservado para cebadores personalizados opcionales
10	**Carga de bibliotecas**

Para obtener información sobre los cebadores personalizados, consulte *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de referencia 15057456).*

Depósito extraíble de la posición n.º 6

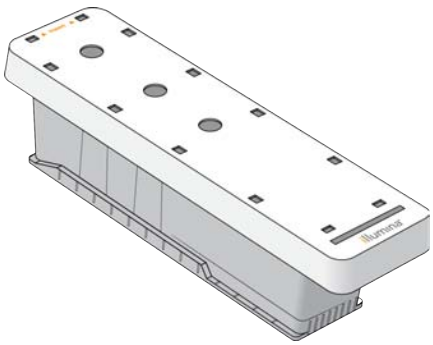
El cartucho de reactivo precargado incluye un reactivo de desnaturalización en la posición 6 que contiene formamida. Para garantizar un desecho seguro de cualquier reactivo no usado tras el experimento de secuenciación, el depósito de la posición 6 es extraíble.

Si desea obtener más información, consulte *Extracción del depósito usado de la posición n.º 6* en la página 31.

Descripción general del cartucho de tampones

El cartucho de tampones es un consumible de un solo uso que contiene tres depósitos que están precargados con tampones y una solución de lavado. El contenido del cartucho de tampones es suficiente para la secuenciación de una celda de flujo.

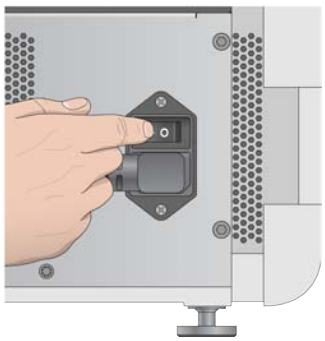
Figura 6 Cartucho de tampones



Puesta en servicio del instrumento

1 Conmute el interruptor de alimentación a la posición **I** (encendido).

Figura 7 Interruptor de alimentación situado en la parte trasera del instrumento



2 Pulse el botón de encendido situado sobre el compartimento de reactivos. El botón de encendido enciende la alimentación del instrumento, e inicia el ordenador y el software integrados en él.

Figura 8 Botón de encendido situado en la parte delantera del instrumento

3 Espere hasta que el sistema operativo se haya cargado completamente.
Cuando el sistema esté preparado, el Software de control de NextSeq (NCS) se iniciará e inicializará el sistema automáticamente. Una vez finalizada la inicialización, se abre la pantalla Home (Inicio).
Si el sistema se ha configurado para que solicite las credenciales de inicio de sesión, inicie sesión con el nombre de usuario y contraseña predeterminados:
- Nombre de usuario: **sbsuser**
- Contraseña: **sbs123**

  En caso contrario, inicie sesión con las credenciales especificadas para su centro.

Botón de encendido

El botón de encendido que se encuentra en la parte delantera del NextSeq enciende la alimentación del instrumento y de su ordenador. El botón de encendido lleva a cabo las siguientes acciones en función del estado de la alimentación del instrumento.

Estado de alimentación	Acción
El instrumento está apagado.	Pulse brevemente el botón para encender la alimentación.
El instrumento está encendido.	Pulse brevemente el botón para apagar la alimentación. Aparece un cuadro de diálogo en la pantalla para confirmar un apagado normal del instrumento.
El instrumento está encendido.	Mantenga pulsado el botón de encendido durante 10 segundos para provocar un apagado forzado del instrumento y su ordenador. Utilice este método para apagar el instrumento solo si no responde.

NOTA

El apagado del instrumento durante un experimento de secuenciación finaliza el experimento de forma inmediata. La finalización de un experimento es definitiva. Los consumibles del experimento no se pueden reutilizar y los datos de secuenciación del experimento no se guardan.

Software del NextSeq

El software del instrumento incluye dos aplicaciones integradas que llevan a cabo experimentos de secuenciación.

- **Software de control de NextSeq (NCS)**: El software de control le guiará por los pasos de configuración de un experimento de secuenciación.
- **Software de análisis en tiempo real (RTA):** Para los experimentos de secuenciación, RTA realiza análisis de imágenes y llamadas de bases durante el experimento. NextSeq 500 utiliza RTA v2, que incluye importantes diferencias de arquitectura y características con respecto a las versiones anteriores. Para obtener más información, consulte *Análisis en tiempo real* en la página 61.

Pantalla de inicio

La interfaz de Software de control de NextSeq (NCS) se abre en la pantalla Home (Inicio).

Figura 9 Pantalla de inicio

- **Sequence** (Secuenciar): Abre una serie de pantallas que le guiarán a través de los pasos de configuración de un experimento de secuenciación.
- **Manage Instrument** (Administrar instrumento): Permite configurar los parámetros del sistema, realizar una comprobación del sistema, actualizar el software y apagar el instrumento. Consulte *Administración del instrumento* en la página 13.
  Si el instrumento está conectado a una red con acceso a Internet, aparece un icono de alerta cuando esté disponible una actualización del software.
- **Perform Wash** (Realizar lavado): Ofrece opciones para realizar un lavado manual del instrumento. Consulte *Realización de un lavado manual* en la página 39.
  Cuando sea necesario realizar un lavado, aparece un icono de alerta en el botón Perform Wash (Realizar lavado).

Pantallas de configuración del experimento

Si selecciona **Sequence** (Secuenciar) en la pantalla Home (Inicio), se abre una serie de pantallas que le guiarán a través de los pasos de configuración de un experimento de secuenciación. El flujo de trabajo estándar incluye pasos para iniciar sesión en BaseSpace, cargar los consumibles del experimento, revisar los parámetros del experimento, ejecutar una comprobación automática del sistema previa al experimento y, a continuación, iniciar el experimento. Para obtener información adicional, consulte *Secuenciación* en la página 21.

Opción de carga avanzada

El flujo de trabajo de configuración estándar del experimento de secuenciación avanza a través de una serie de pantallas para cargar los consumibles del experimento. La opción de carga avanzada combina los pasos para cargar la celda de flujo, el cartucho de tampones y el cartucho de reactivo, y vaciar el contenedor de reactivos usados en una misma pantalla.

Cargue los consumibles del experimento y vacíe el contenedor de reactivos usados en el orden que desee. Cuando haya terminado, seleccione **Load** (Cargar) para desplazar la celda de flujo y el cartucho de reactivo hasta su sitio. El posicionamiento automático de consumibles puede durar hasta 30 segundos. Cuando los componentes del experimento estén en su sitio, seleccione **Next** (Siguiente).

Para activar la opción de carga avanzada, seleccione **Use Advanced Load Consumables** (Utilizar consumibles de carga avanzada) en la pantalla Run Customization (Personalización del experimento). Para obtener más información, consulte *Personalización del experimento* en la página 16.

Iconos de estado

En la esquina superior derecha de cada pantalla verá un icono de estado que le notificará los cambios de las condiciones durante la configuración del experimento o durante el experimento.

Icono de estado	Nombre de estado	Descripción
	Estado OK	El sistema está normal.
	Procesamiento	El sistema está procesando.
	Advertencia	Se ha producido una advertencia. Las advertencias no detienen un experimento o requieren una acción antes de continuar.
	Error	Se ha producido un error. Los errores precisan una acción antes de continuar con el experimento.

Cuando se produce un cambio de estado, el icono cambia a la imagen asociada y parpadea para avisarle. Seleccione el icono para abrir la ventana de estado y visualizar una descripción de la condición.

- Seleccione cualquier elemento de la lista para ver una descripción detallada del estado, así como las instrucciones para resolver el problema, en su caso.
- Seleccione **Acknowledge** (Aceptar) para aceptar el mensaje y **Close** (Cerrar) para cerrar el cuadro de diálogo.

Administración del instrumento

La pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento) contiene los parámetros de configuración y los controles del instrumento.

Figura 10 Pantalla de administración del instrumento

Opción	Volumen y descripción
System Configuration (Configuración del sistema)	Permite modificar los parámetros de configuración del sistema como el nombre de la máquina, el dominio y la conectividad. Consulte *Parámetros de configuración del sistema* en la página 14.
System Customization (Personalización del sistema)	Proporciona parámetros de software opcionales relacionados con el diseño, el sonido y el nombre del instrumento. Consulte *Personalización del sistema* en la página 16.
Software Update (Actualización del software)	Proporciona opciones para actualizar el software del instrumento. Consulte *Actualizaciones de software* en la página 42.
System Check (Comprobación del sistema)	Permite solucionar problemas con el fin de comprobar el estado operativo de los componentes del instrumento. Consulte *Comprobación del sistema* en la página 56.
Shutdown Options (Opciones de apagado)	Permite reiniciar el software del sistema, apagar el instrumento o salir a Windows. Consulte *Opciones de apagado* en la página 17.
Unload Consumables (Descargar consumibles)	Descarga la celda de flujo y el cartucho de reactivo, y eleva los dispensadores del cartucho de tampones y el contenedor de reactivos usados.
About (Acerca de)	Enumera las versiones de software, el nombre del ordenador, el Id.el instrumento y el número de experimentos ejecutados en el instrumento.

Parámetros de configuración del sistema

El sistema se configura durante la instalación. No obstante, si es preciso realizar algún cambio, utilice las opciones de configuración del sistema.

Opción	Descripción
Configuración de red	Proporciona opciones para la configuración de la dirección IP, dirección del servidor de nombre de dominio (DNS, por sus siglas en inglés), nombre del ordenador y nombre del dominio.
Configuración de BaseSpace	Proporciona opciones para métodos de análisis, incluido BaseSpace, BaseSpace Onsite, modo independiente y supervisión de experimento en BaseSpace, así como parámetros de configuración para un inicio de sesión en BaseSpace predeterminado y la generación de informes de estado del instrumento.

La pantalla de configuración del sistema incluye los comandos siguientes:

- **Back** (Atrás): Vuelve a la pantalla anterior.
- **Exit** (Salir): No guarda los cambios y vuelve a la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento).
- **Save** (Guardar): Guarda los cambios y avanza a la pantalla siguiente.

Configuración de red

Opción	Descripción
dirección IP	Póngase en contacto con su administrador de red para obtener las direcciones específicas para el centro. **Obtain an IP address automatically** (Obtener una dirección IP automáticamente): Obtiene la dirección IP con el servidor DHCP. **Use the following IP address** (Utilizar la siguiente dirección IP): Conecta el instrumento a otra ubicación de servidor. • Introduzca una dirección IP. La dirección IP es una serie de cuatro números separados por un punto, similar a 168.62.20.37, por ejemplo. • Introduzca la máscara de subred, que es una subdivisión de la red IP. • Introduzca la puerta de enlace predeterminada, que es el enrutador de la red que se conecta a Internet.
Dirección DNS	**Obtain a DNS address automatically** (Obtener una dirección DNS de forma automática): Lee la dirección DNS asociada a la dirección IP. **Use the following DNS addresses** (Utilizar las siguientes direcciones DNS): Conecta el instrumento a un servidor que traduce nombres de dominio en direcciones IP. • Introduzca la dirección DNS deseada. La dirección DNS es el nombre del servidor utilizado para traducir nombres de dominio en direcciones IP. • Introduzca la dirección DNS alternativa. La dirección alternativa se utiliza si la DNS deseada no puede traducir un nombre de dominio concreto en una dirección IP.

Opción	Descripción
Nombre del ordenador	**Computer name** (Nombre del ordenador): Es el nombre asignado al ordenador del instrumento en el momento de su fabricación. Todos los cambios realizados en el nombre del ordenador pueden afectar a la conectividad y requieren un administrador de red. **Member of domain** (Miembro de dominio): Conecta el instrumento a un dominio. El dominio es el nombre asociado a la conexión a Internet de su centro. Los cambios de dominio requiere un nombre de usuario y contraseña de administrador. **Member of work group** (Miembro de grupo de trabajo): Si el instrumento no está conectado a Internet, especifique un nombre de grupo de trabajo. El nombre del grupo de trabajo es exclusivo de su centro.

Configuración de BaseSpace

Opción	Descripción
Análisis	**BaseSpace**: Envía datos de secuenciación a Illumina BaseSpace. **BaseSpace Onsite:** Envía datos de secuenciación a BaseSpace Onsite. Introduzca el **Server Name** (Nombre del servidor) del servidor de BaseSpace Onsite. • [Opcional] Para las opciones de BaseSpace o BaseSpace Onsite, seleccione la casilla de verificación **Output Folder** (Carpeta de resultados) y, a continuación, seleccione **Browse** (Examinar) y navegue hasta la ubicación que prefiera. Este parámetro guarda una copia de los datos de secuenciación (solo archivos BCL) en una ubicación de red. **Standalone Instrument** (Instrumento independiente): Envía datos de secuenciación a una ubicación de la red del centro. Seleccione **Browse** (Examinar) y navegue hasta la ubicación de red deseada. El software de control genera el nombre de la carpeta de resultados. • [Opcional] Seleccione **Use Run Monitoring** (Utilizar supervisión del experimento) para supervisar el experimento con las herramientas de visualización de BaseSpace. Se requiere iniciar una sesión de BaseSpace.
BaseSpace	Introduzca un **User Name** (Nombre de usuario) y **Password** (Contraseña) para registrar el instrumento con BaseSpace. El nombre de usuario y contraseña introducidos se pueden configurar como credenciales de inicio de sesión predeterminadas. **Use default login and bypass the BaseSpace login screen** (Utilizar inicio de sesión predeterminado e ignorar la pantalla de inicio de sesión de BaseSpace): Configura el nombre de usuario y la contraseña como el inicio de sesión predeterminado para BaseSpace y omite la pantalla de BaseSpace durante la configuración del experimento. **Send instrument health information to Illumina** (Enviar la información de estado del sistema a Illumina): Envía archivos de registro a Illumina. Esta opción no está disponible con BaseSpace Onsite o configuraciones independientes.

Personalización del sistema

Opción	Descripción
Opción de encendido	**Kiosk Mode** (Modo de pantalla completa): Muestra la interfaz del software de control en pantalla completa. El software se ha diseñado para el uso en el modo de pantalla completa. **Windowed Mode** (Modo de Windows): Permite acceder a Windows en el ordenador del instrumento. En este modo, probablemente se alterará la interacción con la interfaz del software, como la ubicación de los botones.
Teclado y audio	**Use on-screen keyboard** (Utilizar teclado en pantalla): Activa el teclado en pantalla para la entrada de datos al instrumento. De manera alternativa, conecte un teclado a un puerto USB externo. **Play audio** (Reproducir audio): Enciende los indicadores de audio para los eventos siguientes: • Cuando se inicia el instrumento • Cuando se inicia un experimento • Cuando se producen ciertos errores • Cuando se requiere interacción del usuario • Cuando ha finalizado un experimento
Imagen del avatar	**Avatar Image** (Imagen de avatar): Seleccione **Browse** (Examinar) para navegar hasta la imagen que prefiera del instrumento. En el campo Name (Nombre), introduzca el nombre de instrumento deseado. La imagen y el nombre aparecen en la parte superior de cada pantalla.

Personalización del experimento

Opción	Descripción
Carga avanzada	**Use Advanced Load Consumables** (Usar consumibles de carga avanzada): Seleccione esta opción para cargar consumibles desde una sola pantalla en lugar de la serie de pantallas de configuración del experimento. Consulte *Opción de carga avanzada* en la página 12.
Purgar consumibles	**Purge Consumables at End of Run** (Purgar consumibles al finalizar experimento): Activada de manera predeterminada, esta configuración purga los reactivos sin usar del cartucho de reactivo al contenedor de reactivos usados automáticamente tras un experimento. Cuando este parámetro esté desactivado, deseche los reactivos de forma manual. El purgado de consumibles requiere tiempo adicional. Puede desactivar este parámetro para un experimento de forma independiente con la función Edit (Editar) de la pantalla Run Setup (Configuración del experimento).
Omitir la confirmación de comprobación	**Skip Pre-Run Check Confirmation** (Omitir la confirmación de comprobación previa al experimento): Seleccione esta configuración para iniciar la secuenciación de forma automática después de una comprobación automática satisfactoria. Si la comprobación automática falla por cualquier motivo, resuelva el error antes de continuar.

Edición de configuración del experimento para purgar consumibles

Cambie el parámetro de purga de consumibles para un experimento de manera independiente con la función Edit (Editar) de la pantalla Run Setup (Configuración del experimento).

- **Configuración de BaseSpace o BaseSpace Onsite:** Seleccione el icono **Edit** (Editar) en la pantalla Run Setup (Configuración del experimento). Cuando termine, seleccione el icono **Save** (Guardar).
- **Configuración independiente:** Seleccione el icono **Edit** (Editar) en la pantalla Run Setup (Configuración del experimento). Cuando termine, seleccione **Save** (Guardar).

Opciones de apagado

Las opciones de apagado no son necesarias para el funcionamiento normal.

Opción	Descripción
Shut Down (Apagar)	Apaga el software y la alimentación del instrumento. Consulte *Apagado del instrumento* en la página 44.
Restart (Reiniciar)	Reinicia Windows y el software de control y, a continuación, inicia el instrumento. Este comando se utiliza generalmente durante una sesión de solución de problemas o cuando lo indica un representante del servicio de asistencia técnica de Illumina.
Exit to Windows (Salir a Windows)	Cierra el software de control y accede directamente al sistema operativo. El comando Exit to Windows (Salir a Windows) sirve para realizar tareas administrativas. El funcionamiento normal se realiza desde la interfaz del software en el modo de pantalla completa.

Visor del análisis de secuenciación

El software del visor del análisis de secuenciación (SAV) muestra los criterios de medición de la secuenciación generados durante el experimento. Estos datos aparecen en forma de diagramas, gráficos y tablas según los datos generados por RTA y escritos en los archivos InterOp. Los datos se actualizan conforme avanza el experimento. Seleccione **Refresh** (Actualizar) en cualquier momento durante el experimento para ver los datos actualizados. Si desea obtener más información, consulte la *Guía del usuario del visor del análisis de secuenciación* (n.º de referencia 15020619).

El SAV se incluye en el paquete de software del sistema NextSeq instalado en el ordenador del instrumento. También puede instalar el SAV en otro ordenador conectado a la misma red que el instrumento para supervisar de manera remota los criterios de medición del experimento.

Duración del experimento de secuenciación

La duración del experimento de secuenciación depende del número de ciclos realizados. La longitud máxima del experimento es la de un experimento "paired-end" de 150 ciclos en cada lectura (2 x 150), más hasta ocho ciclos por cada uno para dos lecturas de índice.

Para obtener más información sobre las duraciones previstas y otras especificaciones del sistema, visite la página de especificaciones de NextSeq 500 en el sitio web de Illumina.

Número de ciclos de una lectura

En un experimento de secuenciación, el número de ciclos realizados en una lectura es un ciclo más que el número de ciclos analizados. Por ejemplo, un experimento "paired-end" de 150 ciclos realiza dos lecturas de 151 ciclos (2 × 151) para un total de 302 ciclos. Al final del experimento, se habrán analizado 2 × 150 ciclos. El ciclo adicional es necesario para los cálculos de hebra retrasada y hebra adelantada.

Consumibles y equipos proporcionados por el usuario

Los consumibles y equipos siguientes se utilizan en el NextSeq 500.

Consumibles suministrados por el usuario para los experimentos de secuenciación

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOH 1 N (hidróxido sódico)	Proveedor de laboratorio general	Desnaturalización de bibliotecas, dilución a 0,2 N
200 mM Tris-HCl, pH7	Proveedor de laboratorio general	Desnaturalización de bibliotecas
Paños humedecidos en alcohol isopropilo al 70 % o Etanol al 70 %	VWR, n.º de catálogo 95041-714 (o equivalente) Proveedor de laboratorio general	Limpieza de la celda de flujo y fines generales
Guantes desechables, sin polvos	Proveedor de laboratorio general	Fines generales
Toallita de laboratorio sin pelusa	VWR, n.º de catálogo 21905-026 (o equivalente)	Limpieza de la celda de flujo

Consumibles suministrados por el usuario para el mantenimiento del instrumento

Consumible	Proveedor	Finalidad
NaOCl, 5 % (hipoclorito de sodio)	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo 239305 (o equivalente)	Al lavar el instrumento con el lavado manual posterior al experimento; diluido al 0,12 %.
Tween 20	Sigma-Aldrich, n.º de catálogo P7949	Al lavar el instrumento con las opciones de lavado manual; diluido al 0,05 %.
Agua de laboratorio	Proveedor de laboratorio general	Lavado del instrumento (lavado manual)

Directrices para el agua de laboratorio

Utilice siempre agua de laboratorio para los procedimientos del instrumento. No utilice nunca agua de grifo ni desionizada. A continuación, se muestran ejemplos de aguas de laboratorio aceptables:

- Illumina PW1
- Agua de 18 Megohmios (MΩ)
- Agua Milli-Q
- Agua Super-Q
- Agua de biología molecular

Equipo proporcionado por el usuario

Elemento	Proveedor
Congelador, entre -25 y -15 °C, sin hielo	Proveedor de laboratorio general
Hielera	Proveedor de laboratorio general
Frigorífico, entre 2 y 8 °C	Proveedor de laboratorio general

Secuenciación

Introducción 22
Flujo de trabajo de secuenciación 23
Preparación del cartucho de reactivo 24
Preparación de la celda de flujo 25
Preparación de bibliotecas para secuenciación 27
Configuración de un experimento de secuenciación 28
Supervisión del progreso del experimento 34
Lavado automático posterior al experimento 36

Introducción

Para ejecutar un experimento de secuenciación en el NextSeq 500, prepare un cartucho de reactivo y una celda de flujo y, a continuación, siga los mensajes del software para configurar e iniciar el experimento. La generación de grupos y la secuenciación se realizan en el instrumento. Tras el experimento, se inicia un lavado del instrumento de forma automática mediante el uso de los componentes cargados en el instrumento.

Generación de grupos

Durante la generación de grupos, las moléculas individuales de ADN se unen a la superficie de la celda de flujo y, a continuación, se amplifican para formar grupos.

Secuenciación

Las imágenes de los grupos se obtienen mediante el uso de química de secuenciación de dos canales y combinaciones de filtro específicas para cada uno de los terminadores de cadena marcados con fluorescencia. Tras finalizar la adquisición de imágenes de una placa en la celda de flujo, se procede a la adquisición de imágenes de la placa siguiente. El proceso se repite para cada ciclo de secuenciación. Después del análisis de imágenes, el software ejecuta las llamadas de bases, el filtrado y la puntuación de calidad.

Supervise el progreso y las estadísticas del experimento desde la interfaz del software de control, en la ficha Run (Experimento) de BaseSpace o en un ordenador conectado a la red mediante el uso del software del visor del análisis de secuenciación (SAV). Consulte *Visor del análisis de secuenciación* en la página 17.

Análisis

A medida que el experimento avanza, el software de control transfiere de forma automática archivos de llamadas de bases (BCL) a BaseSpace o a la ubicación de salida especificada para el análisis secundario.

En función de la aplicación, hay varios métodos de análisis disponibles. Si desea obtener más información, consulte *Ayuda de BaseSpace (help.basespace.illumina.com)*.

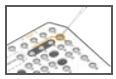
Flujo de trabajo de secuenciación

Para las configuraciones que utilizan BaseSpace o BaseSpace Onsite de Illumina: Configure el experimento en la ficha BaseSpace Prep (Preparación de BaseSpace). Consulte la *Ayuda de BaseSpace (help.basespace.illumina.com)*.

Prepare un cartucho de reactivo nuevo: descongélelo e inspecciónelo.

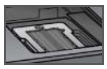
Prepare una celda de flujo nueva: deje que alcance la temperatura ambiente, desenvuélvala e inspecciónela.

Desnaturalice y diluya bibliotecas (no se aplica a todos los tipos de bibliotecas). Consulte *Desnaturalización y dilución de las bibliotecas para el sistema NextSeq (n.º de referencia 15048776)*.



Cargue la dilución de bibliotecas en el cartucho de reactivo del depósito n.º 10.

En la interfaz de software, seleccione **Sequence** (Secuenciar) para iniciar los pasos de configuración del experimento.



Cargue la celda de flujo.

Vacíe y vuelva a cargar el contenedor de reactivos usados.

Cargue el cartucho de tampones y el cartucho de reactivo.

Revise los parámetros del experimento y compruebe los resultados de la comprobación automática.

Seleccione **Start** (Iniciar).

Supervise el experimento desde la interfaz del software de control, en la ficha Run (Experimento) de BaseSpace o en un ordenador conectado a la red con el visor del análisis de secuenciación.

El lavado del instrumento se inicia de forma automática tras finalizar la secuenciación.

Preparación del cartucho de reactivo

1 Extraiga el cartucho de reactivo del almacenamiento a una temperatura de entre -25 y -15 °C.

2 Introdúzcalo en un baño con agua a temperatura ambiente hasta que se descongele (aprox. 60 minutos). No sumerja el cartucho.

3 Golpetee ligeramente en el banco para sacar el agua de la base y, a continuación, seque la base.

NOTA

[Método alternativo] Descongele los reactivos por la noche a una temperatura de 2 a 8 °C. Los reactivos requieren un mínimo de 18 horas para descongelarse. A esta temperatura, os reactivos permanecen estables hasta una semana.

4 Inviértalo para mezclar los reactivos.

5 Inspeccione las posiciones 29, 30, 31 y 32 para asegurarse de que los reactivos estén descongelados.

6 Golpetee ligeramente en el banco para reducir las burbujas de aire.

ADVERTENCIA

Este grupo de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina que puede alterar la capacidad reproductora. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos puesto que puede provocar lesiones. Utilice equipos de protección, entre ellos, gafas de protección, guantes y bata de laboratorio. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normas de seguridad gubernamentales de su región. Si desea obtener información de seguridad, salud y medio ambiente, consulte la hoja de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.html.

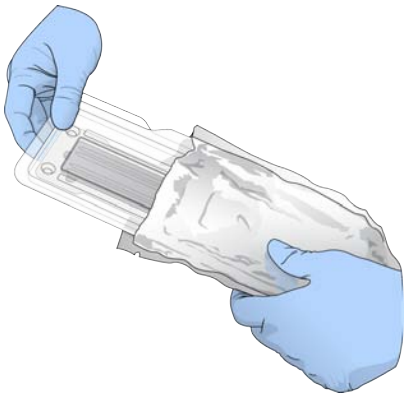
Preparación de la celda de flujo

1. Extraiga un nuevo paquete de celda de flujo de su almacenamiento a una temperatura de entre 2 y 8 °C.
2. Deje el paquete de la celda de flujo desembalado a temperatura ambiente durante 30 minutos.

   NOTA
   Si el embalaje de aluminio está intacto, la celda de flujo puede permanecer a temperatura ambiente hasta 12 horas. Evite el enfriamiento y el calentamiento repetidos de la celda de flujo.

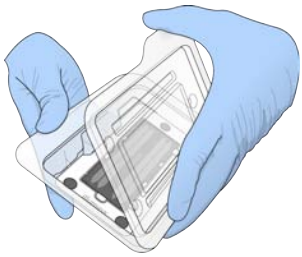
3. Extraiga la celda de flujo del embalaje de aluminio.

   Figura 11 Extracción del embalaje de aluminio

4. Abra el estuche de plástico transparente y extraiga la celda de flujo.

   Figura 12 Extracción del estuche

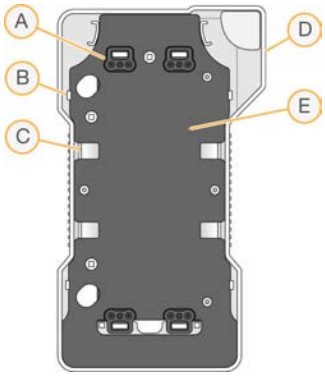
   

5. Limpie la superficie de cristal de la celda de flujo con un paño sin pelusa humedecido en alcohol. Seque el cristal con una toallita de laboratorio sin pelusa.

Inspección de la celda de flujo

1. Asegúrese de que los puertos de la celda de flujo no están obstruidos.
2. Asegúrese de que las juntas de los puertos estén colocadas correctamente y que los postes de plástico blancos sean visibles.

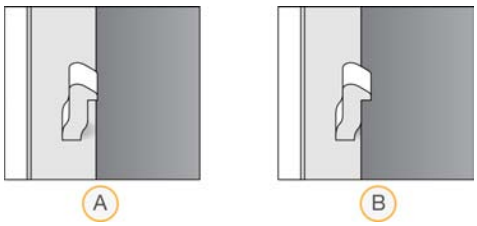
Figura 13 Componentes de la celda de flujo



A Juntas del puerto (4)
B Pinzas de retención (4)
C Pinzas de resorte (4)
D Marco del cartucho de la celda de flujo
E Placa del soporte

3 Asegúrese de que las cuatro pinzas de retención blancas estén encajadas en el borde de la placa negra del soporte.
Si la placa no está fijada debajo de las pinzas, presione suavemente la placa negra del soporte y el marco blanco del cartucho entre sí hasta que la placa encaje bien debajo de las pinzas.

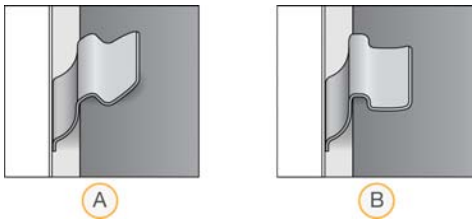
Figura 14 Inspección de la pinza de retención



A Posición incorrecta: La pinza de retención no encaja sobre el borde de la placa del soporte.
B Posición correcta: La pinza de retención encaja sobre el borde de la placa del soporte.

4 Asegúrese de que las cuatro pinzas de resorte metálicas queden en posición horizontal en relación con la placa negra del soporte.

Figura 15 Inspección de la pinza de resorte



A Posición incorrecta: La pinza de resorte no queda en posición horizontal en relación con la placa del soporte.
B Posición correcta: La pinza de resorte queda en posición horizontal en relación con la placa del soporte.

Preparación de bibliotecas para secuenciación

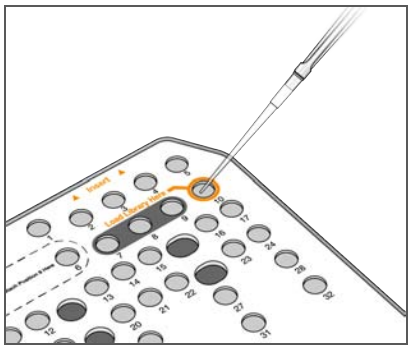
Bibliotecas de desnaturalización y dilución

Si el tipo de biblioteca lo necesita, desnaturalice y diluya las bibliotecas, y añada el control PhiX. La concentración de carga y volumen de bibliotecas varía en función de la versión de NCS que utilice. Para obtener más información, consulte *Desnaturalización y dilución de las bibliotecas para el sistema NextSeq (n.º de referencia 15048776)*.

Carga de bibliotecas en el cartucho de reactivo

1. Limpie el sello metálico que cubre el depósito n.º 10, con la etiqueta **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí), con una toallita sin pelusa.
2. Perfore el sello con una punta de pipeta de 1 ml limpia.
3. Cargue las bibliotecas en el depósito n.º 10 marcado como **Load Library Here** (Cargar biblioteca aquí). Evite tocar el cierre metálico cuando dispense las bibliotecas.

Figura 16 Carga de bibliotecas



Configuración de un experimento de secuenciación

En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Sequence** (Secuenciar).

El comando Sequence (Secuenciar) abre la puerta del compartimento de adquisición de imágenes, suelta los consumibles del experimento anterior y abre el conjunto de pantallas de configuración del experimento. Suele producirse un breve retraso.

Si el instrumento se configura para BaseSpace o BaseSpace Onsite, se abre la pantalla de inicio de sesión de BaseSpace.

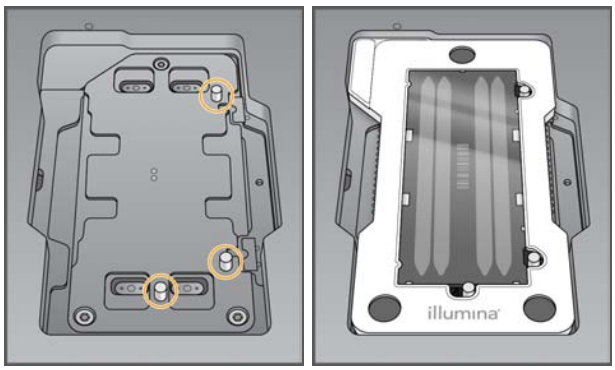
Inicio de sesión en BaseSpace

1. Introduzca su nombre de usuario y contraseña de BaseSpace.
2. Seleccione **Next** (Siguiente).

Carga de la celda de flujo

1. Extraiga la celda de flujo utilizada del experimento anterior.
2. Utilice los pasadores de alineación para colocar la celda de flujo en la platina.

Figura 17 Carga de la celda de flujo



3. Seleccione **Load** (Cargar). La puerta se cierra automáticamente, el Id. de la celda de flujo aparece en la pantalla y se comprueban los sensores.
4. Seleccione **Next** (Siguiente).

Vaciado del contenedor de reactivos usados

1. Extraiga el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de conformidad con las normas aplicables.

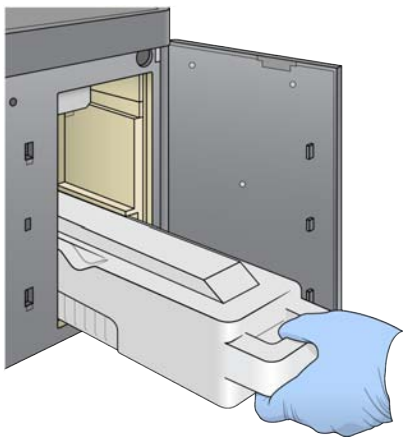
Figura 18 Extracción del contenedor de reactivos usados

NOTA
Cuando retire el contenedor, coloque la otra mano debajo de este para sujetarlo.

ADVERTENCIA
Este grupo de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina que puede alterar la capacidad reproductora. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos puesto que puede provocar lesiones. Utilice equipos de protección, entre ellos, gafas de protección, guantes y bata de laboratorio. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normas de seguridad gubernamentales de su región. Si desea obtener información de seguridad, salud y medio ambiente, consulte la hoja de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.html.

2 Deslice el contenedor de reactivos usados vacío dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga. Oirá un clic que indica que el contenedor está en su sitio.

Figura 19 Carga del contenedor de reactivos usados vacío



Carga del cartucho de tampones

1 Extraiga el cartucho de tampones usado del compartimento superior.

2 Deslice un nuevo cartucho de tampones dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga. Oirá un clic que indica que el cartucho está en su sitio, el Id. del cartucho de tampones aparece en la pantalla y se comprueba el sensor.

Figura 20 Carga del cartucho de tampones

3 Cierre la puerta del compartimento de tampones y seleccione **Next** (Siguiente).

Carga del cartucho de reactivo

1 Extraiga el cartucho de reactivo usado del compartimento de reactivos. Elimine los contenidos no usados de conformidad con las normas aplicables.

ADVERTENCIA

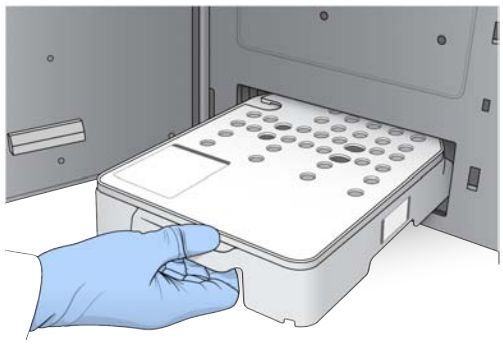
Este grupo de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina que puede alterar la capacidad reproductora. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos puesto que puede provocar lesiones. Utilice equipos de protección, entre ellos, gafas de protección, guantes y bata de laboratorio. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normas de seguridad gubernamentales de su región. Si desea obtener información de seguridad, salud y medio ambiente, consulte la hoja de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.html.

NOTA

Para garantizar un desecho seguro del reactivo no usado, el depósito de la posición 6 es extraíble. Si desea obtener más información, consulte *Extracción del depósito usado de la posición n.º 6* en la página 31.

2 Deslice el cartucho de reactivos en el compartimento de reactivos hasta que el cartucho se detenga y, a continuación, cierre la puerta del compartimento de reactivos.

Figura 21 Carga del cartucho de reactivo



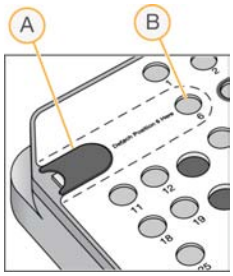
3 Seleccione **Load** (Cargar). El software desplaza el cartucho hasta su posición de forma automática (aprox. 30 segundos), el Id. del cartucho de reactivos aparece en la pantalla y se comprueban los sensores.

4 Seleccione **Next** (Siguiente).

Extracción del depósito usado de la posición n.º 6

1 Tras la extracción del cartucho de reactivo ***usado*** del instrumento, extraiga la cubierta protectora de goma sobre la ranura junto a la posición n.º 6.

Figura 22 Posición n.º 6 extraíble



A Cubierta protectora de goma
B Posición n.º 6

2 Presione hacia abajo la pestaña de plástico transparente y presione hacia la izquierda para extraer el depósito.

3 Deseche el depósito de conformidad con las normativas aplicables.

Especificación de los parámetros del experimento

Los pasos de la pantalla Run Setup (Configuración del experimento) difieren en función de la configuración del sistema:

- **BaseSpace o BaseSpace Onsite:** La pantalla Run Setup (Configuración del experimento) enumera los experimentos configurados en BaseSpace. Si el experimento previsto no aparece en la pantalla Run Setup (Configuración del experimento), asegúrese de que el experimento esté marcado para su secuenciación en BaseSpace.
- **Independiente:** La pantalla Run Setup (Configuración del experimento) incluye campos para la definición de los parámetros del experimento.

Selección del experimento disponible (configuración de BaseSpace)

1 Seleccione un nombre de experimento de la lista de experimentos disponibles.

Utilice las flechas arriba y abajo para desplazarse por la lista o introduzca un nombre de experimento en el campo Search (Buscar).

2 Seleccione **Next** (Siguiente).

3 Confirme los parámetros del experimento.
- **Run Name** (Nombre del experimento): Nombre del experimento asignado en BaseSpace.
- **Library ID** (Id. de biblioteca): Nombre de las bibliotecas agrupadas asignado en BaseSpace.
- **Recipe** (Fórmula): Nombre de la fórmula, bien **NextSeq High** (Alto) o bien **NextSeq Mid** (Medio) en función del cartucho de reactivo utilizado en el experimento.
- **Read Type** (Tipo de lectura): Lectura única o "paired-end".
- **Read Length** (Longitud de lectura): Número de ciclos de cada lectura.
- [Opcional] Cebadores personalizados, si corresponde.

4 [Opcional] Seleccione el icono **Edit** (Editar) para cambiar los parámetros del experimento. Cuando termine, seleccione **Save** (Guardar).
- **Run parameters** (Parámetros del experimento): Cambie el número de lecturas o el número de ciclos por lectura.
- **Custom primers** (Cebadores personalizados): Cambie la configuración de los cebadores personalizados. Para obtener más información, consulte *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de referencia 15057456)*.
- **Purge consumables for this run** (Purgar consumibles para este experimento): Cambie el parámetro para purgar los consumibles de forma automática tras el experimento actual. Para obtener más información, consulte *Personalización del experimento* en la página 16.

5 Seleccione **Next** (Siguiente).

Introducción de los parámetros del experimento (configuración independiente)

1 Introduzca el nombre de experimento que usted prefiera.

2 [Opcional] Introduzca el Id. de biblioteca que usted prefiera.

3 En la lista desplegable Recipe (Fórmula), seleccione una fórmula. Solo se muestran las fórmulas compatibles.

4 Seleccione un tipo de lectura, **Single Read** (Única) o **Paired End** ("Paired-end").

5 Introduzca el número de ciclos de cada lectura en el experimento de secuenciación.
- **Read 1** (Lectura 1): Introduzca un valor de, como máximo, 151 ciclos.
- **Read 2** (Lectura 2): Introduzca un valor de, como máximo, 151 ciclos. Este valor suele coincidir con el número de ciclos de la Lectura 1.
- **Index 1** (Índice 1): Introduzca el número de ciclos necesario para el cebador del Índice 1 (i7).
- **Index 2** (Índice 2): Introduzca el número de ciclos necesario para el cebador del Índice 2 (i5).

El software de control confirma las entradas con los criterios siguientes:
- El número total de ciclos no supera el máximo número permitido de ciclos.
- Los ciclos para la Lectura 1 son superiores a los cinco ciclos utilizadas para la generación de plantillas.

- El número de ciclos de Lectura del índice no superen los ciclos de Lectura 1 y Lectura 2.

6 [Opcional] Si utiliza cebadores personalizados, seleccione la casilla de verificación para los cebadores usados. Para obtener más información, consulte *Guía de cebadores personalizados de NextSeq (n.º de referencia 15057456)*.
- **Read 1** (Lectura 1): El cebador personalizado para la Lectura 1.
- **Read 2** (Lectura 2): El cebador personalizado para la Lectura 2.
- **Index 1** (Índice 1): El cebador personalizado para el Índice 1.
- **Index 2** (Índice 2): El cebador personalizado para el Índice 2.

7 [Opcional] Seleccione el icono **Edit** (Editar) para cambiar los parámetros del experimento. Cuando termine, seleccione **Save** (Guardar).
- **Output folder location** (Ubicación de la carpeta de resultados): Cambie la ubicación de la carpeta de resultados para el experimento actual. Seleccione **Browse** (Examinar) para ir a una ubicación de red.
- **Purge consumables for this run** (Purgar consumibles para este experimento): Cambie el ajuste para purgar los consumibles de forma automática tras el experimento actual. Para obtener más información, consulte *Personalización del experimento* en la página 16.
- **Use run monitoring for this run** (Utilizar supervisión del experimento para este experimento): Cambie el parámetro para utilizar la supervisión del experimento en BaseSpace.

8 Seleccione **Next** (Siguiente).

Revisión de la comprobación automática

El software ejecuta una comprobación automática del sistema. Durante la comprobación, aparecen los indicadores siguientes en la pantalla:

- **Marca de verificación gris:** Todavía no se ha efectuado la comprobación.
- **Icono de progreso:** La comprobación está en curso.
- **Marca de verificación verde:** Se ha superado la comprobación.
- **Equis roja:** No se ha superado la comprobación. Todos los elementos que no la superen, precisan una acción antes de continuar. Consulte *Solución de errores de comprobación automática* en la página 50.

Para detener una comprobación automática en curso, seleccione el icono en la esquina inferior derecha. Para reiniciar la comprobación, seleccione el icono . La comprobación reanuda la primera comprobación incompleta o con error.

Para ver los resultados de cada comprobación dentro de una categoría, seleccione el icono para ampliar la categoría.

Inicio del experimento

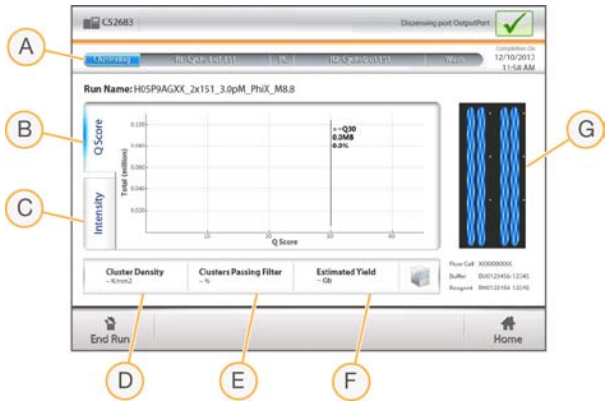
Una vez finalizada la comprobación automática, seleccione **Start** (Iniciar). Empieza el experimento de secuenciación.

Para configurar el sistema para que inicie el experimento automáticamente después de una comprobación satisfactoria, consulte *Personalización del experimento* en la página 16.

Supervisión del progreso del experimento

Supervise el progreso del experimento, las intensidades y las puntuaciones de calidad mientras los criterios de medición aparecen en la pantalla.

Figura 23 Progreso y criterios de medición del experimento de secuenciación



A **Run progress** (Progreso del experimento): Muestra el paso actual y el número de ciclos completados para cada lectura. La barra de progreso no es proporcional a la velocidad del experimento de cada paso. Utilice el tiempo restante de la esquina superior derecha para determinar la duración real.

B **Q-Score** (Puntuación Q): Muestra la distribución de las puntuaciones de calidad (puntuaciones Q). Consulte *Puntuación de calidad* en la página 67.

C **Intensity** (Intensidad): Muestra el valor de las intensidades de grupos del percentil 90 para cada placa. Los colores del diagrama indican cada base: Rojo es A, verde es C, azul es G y negro es T. Los colores coinciden con los indicadores de las bases utilizados en Sequencing Analysis Software (SAV).

D **Cluster Density (K/mm²)** (Densidad de grupos [K/mm²]): Muestra el número de grupos detectados para el experimento.

E **Clusters Passing Filter (%)** (Grupos que superan el filtro [%]): Muestra el porcentaje de grupos que superan el filtro. Consulte *Grupos que superan el filtro* en la página 64.

F **Estimated Yield (Gb)** (Rendimiento estimado [Gb]): Muestra el número proyectado de bases para el experimento.

G **Flow cell image** (Imagen de la celda de flujo): Muestra el par de carriles para el que se están adquiriendo las imágenes, mientras que el otro par de carriles se encuentra en el paso de la química.

NOTA
Tras seleccionar Home (Inicio), no es posible volver a ver los criterios de medición del experimento. No obstante, puede acceder a los criterios de medición del experimento en BaseSpace o desde un ordenador independiente mediante el uso del visor del análisis de secuenciación (SAV).

Ciclos de criterios de medición del experimento

Los criterios de medición del experimento aparecen en distintos puntos de un experimento.

- Durante los pasos de generación de grupos, no se mostrarán los criterios de medición.
- Los primeros cinco ciclos se reservan para la generación de plantillas.
- Los criterios de medición del experimento aparecen tras el ciclo 25, incluida la densidad de grupos, los grupos que superan el filtro, el rendimiento y las puntuaciones de calidad.

Transferencia de datos

En función de la configuración de análisis seleccionada, durante el experimento aparece un icono en la pantalla para indicar el estado de la transferencia de datos.

Estado	BaseSpace de Illumina	BaseSpace Onsite	Instrumento independiente
Conectado			
Conectado y transfiriendo datos			
Desconectado			

Si la transferencia de datos se interrumpe durante el experimento, los datos se almacenan temporalmente en el ordenador del instrumento. Al restablecer la conexión, la transferencia de datos se reanuda de manera automática. Si la conexión no se restablece antes de finalizar el experimento, se deben eliminar manualmente los datos del ordenador del instrumento antes de que pueda empezar el siguiente experimento.

Servicio de copia de experimento

El paquete de software del sistema NextSeq incluye un servicio de copia de experimento. RTA v2 solicita al servicio que copie los archivos desde una ubicación de origen hasta una ubicación de destino y el servicio procesa las solicitudes de copia en el orden recibido. Si se produce una excepción, el archivo se vuelve a poner en la cola para copia según el número de archivos en la cola de copias.

Lavado automático posterior al experimento

Cuando el experimento de secuenciación haya terminado, el software inicia un lavado automático posterior al experimento con una solución de lavado suministrada en el cartucho de tampones e NaOCl suministrado en el cartucho de reactivo.

El lavado automático posterior al experimento dura aproximadamente 90 minutos. Al finalizar el lavado, el botón Home (Inicio) se activa. Los resultados de secuenciación permanecen visibles en la pantalla durante el lavado.

NOTA
El lavado automático posterior al experimento bombea solución de lavado a través del sistema desde el cartucho de tampones a los depósitos de lavado reservados en el cartucho de reactivos y, a continuación, al contenedor de reactivos usados.

Después del lavado

Después del lavado, los dispensadores permanecen en la posición bajada para evitar que entre aire en el sistema. Deje los cartuchos en su sitio hasta el siguiente experimento.

Mantenimiento

Capítulo 3

Introducción 38
Realización de un lavado manual 39
Actualizaciones de software 42
Apagado del instrumento 44

Introducción

Los procedimientos de mantenimiento incluyen lavados manuales del instrumento y actualizaciones del software del sistema si están disponibles.

- **Lavados del instrumento**: Un lavado automático posterior al experimento después de cada experimento de secuenciación mantiene el rendimiento del instrumento. Sin embargo, es necesario realizar un lavado manual de forma periódica en ciertas condiciones. Consulte *Realización de un lavado manual* en la página 39.
- **Actualizaciones de software**: Si hay una versión actualizada del software disponible, puede instalar la actualización de forma automática a través de una conexión a BaseSpace o manualmente después de descargar el instalador del sitio web de Illumina. Consulte *Actualizaciones de software* en la página 42.

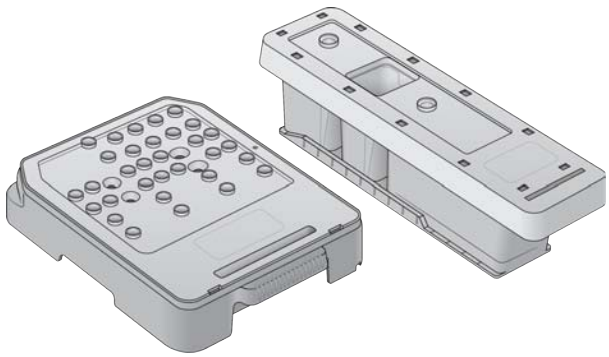
Realización de un lavado manual

Los lavados manuales se inician en la pantalla Home (Inicio). Entre las opciones de lavado se incluye el lavado rápido y el lavado manual posterior al experimento.

Tipos de lavado	Descripción
Lavado rápido **Duración: 20 minutos**	Lava el sistema con una solución de lavado proporcionada por el usuario de agua de laboratorio y Tween 20 (cartucho de lavado de tampones). Es necesario cada 14 días que el instrumento permanezca inactivo o después de un apagado.
Lavado manual posterior al experimento **Duración: 90 minutos**	Lava el sistema con una solución de lavado proporcionada por el usuario de agua de laboratorio y Tween 20 (cartucho de lavado de tampones) e hipoclorito de sodio al 0,12 % (cartucho de lavado de reactivos). Es necesario si no se ha realizado el lavado automático posterior al experimento.

Para llevar a cabo un lavado manual, se debe usar el cartucho de lavado de reactivos y el cartucho de lavado de tampones suministrados con el instrumento, así como una celda de flujo usada. Una celda de flujo usada se puede utilizar hasta 20 veces para los lavados del instrumento.

Figura 24 Cartucho de lavado de reactivos y cartucho de lavado de tampones



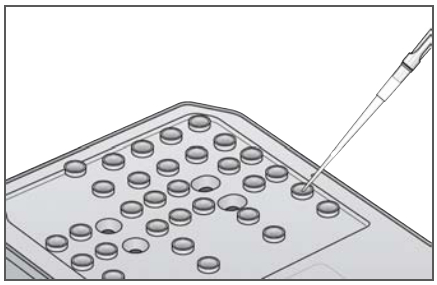
Preparación para un lavado manual posterior al experimento

Consumibles proporcionados por el usuario	Volumen y descripción
• NaOCl	1 ml, diluido al 0,12 % Se carga en el cartucho de lavado de reactivos (posición n.º 28)
• Tween 20 al 100 % • Agua de laboratorio	Se utiliza para realizar una solución de lavado Tween 20 de 125 ml al 0,05 %. Se carga en el cartucho de lavado de tampones (depósito central).

NOTA
Utilice siempre una dilución de NaOCl nueva preparada en las últimas **24 horas**. Si prepara un volumen superior a 1 ml, almacene la dilución sobrante a una temperatura entre 2 y 8 °C para utilizar en las próximas 24 horas. De lo contrario, deseche la dilución de NaOCl sobrante.

1 Combine los siguientes volúmenes en un tubo de microcentrífuga para que dé como resultado 1 ml de NaOCl al 0,12 %:
   - NaOCl al 5 % (24 µl)
   - Agua de laboratorio (976 µl)
2 Invierta el tubo para realizar la mezcla.
3 Añada 1 ml de NaOCl al 0,12 % al cartucho de lavado de reactivos. El depósito correcto es equivalente a la posición n.º **28** en el cartucho precargado.

Figura 25 Carga de NaOCl



4 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una solución de lavado Tween 20 al 0,05 %:
   - Tween 20 al 100 % (62 µl)
   - Agua de laboratorio (125 ml)
5 Añada 125 ml de solución de lavado en el depósito central del cartucho de lavado de tampones.
6 Seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado) y, a continuación, seleccione **Manual Post-Run Wash** (Lavado manual posterior al experimento).

Preparación para un lavado rápido

Consumibles proporcionados por el usuario	Volumen y descripción
• Tween 20 al 100 % • Agua de laboratorio	Se utiliza para realizar una solución de lavado Tween 20 de 40 ml al 0,05 %. Se carga en el cartucho de lavado de tampones (depósito central).

1 Combine los siguientes volúmenes para que dé como resultado una solución de lavado Tween 20 al 0,05 %:
   - Tween 20 al 100 % (20 µl)
   - Agua de laboratorio (40 ml)
2 Añada 40 ml de solución de lavado al depósito central del cartucho de lavado de tampones.
3 Seleccione **Perform Wash** (Selección de lavado) y, a continuación, seleccione **Quick Wash** (Lavado rápido).

Carga de una celda de flujo usada y de los cartuchos de lavado

1. Si no hay ninguna celda de flujo usada, cargue una. Seleccione **Load** (Cargar) y, a continuación, seleccione **Next** (Siguiente).
2. Extraiga el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de conformidad con las normas aplicables.

   ADVERTENCIA

   Este grupo de reactivos contiene formamida, una amida alifática que es una toxina que puede alterar la capacidad reproductora. Evite su inhalación, ingestión y el contacto con la piel o los ojos puesto que puede provocar lesiones. Utilice equipos de protección, entre ellos, gafas de protección, guantes y bata de laboratorio. Manipule los reactivos usados como residuos químicos y deséchelos de conformidad con las normas de seguridad gubernamentales de su región. Si desea obtener información de seguridad, salud y medio ambiente, consulte la hoja de datos de seguridad de este kit en support.illumina.com/sds.html.
3. Deslice el contenedor de reactivos usados vacío dentro del compartimento de tampones hasta que se detenga.
4. Extraiga el cartucho de tampones usados del experimento anterior, si todavía no lo ha hecho.
5. Cargue el cartucho de lavado de tampones que contiene la solución de lavado.
6. Extraiga el cartucho de reactivos usados del experimento anterior, si todavía no lo ha hecho.
7. Cargue el cartucho de lavado de reactivos.
8. Seleccione **Next** (Siguiente). La comprobación de prelavado comienza de forma automática.

Inicio del lavado

1. Seleccione **Start** (Iniciar).
2. Una vez finalice el experimento, seleccione **Home** (Inicio).

Después del lavado

Después del lavado, los dispensadores permanecen en la posición bajada para evitar que entre aire en el sistema. Deje los cartuchos en su sitio hasta el siguiente experimento.

Actualizaciones de software

Las actualizaciones de software están incluidas en el paquete de software denominado System Suite, que incluye el software siguiente:

- Software de control de NextSeq (NCS)
- Fórmulas de NextSeq
- RTA v2
- Software de servicio de NextSeq (NSS)
- Visor del análisis de secuenciación (SAV)
- BaseSpace Broker

Puede instalar actualizaciones de software de forma automática con una conexión a Internet o manualmente desde una ubicación de red o USB.

- **Automatic updates** (Actualizaciones automáticas): Si el instrumento está conectado a una red con acceso a Internet, aparecerá un icono de alerta en el botón Manage Instrument (Administrar instrumento), en la pantalla Home (Inicio), cuando haya una actualización de software disponible.
- **Manual updates** (Actualizaciones manuales): Descargue el instalador de System Suite desde la página de asistencia de NextSeq 500 en el sitio web de Illumina.

Actualización automática de software

1. Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
2. Seleccione **Software Update** (Actualización del software).
3. Seleccione **Install the update already downloaded from BaseSpace** (Instalar la actualización descargada de BaseSpace).
4. Seleccione el icono **Update** (Actualizar) para iniciar la actualización. Se abre un cuadro de diálogo para confirmar el comando.
5. Siga las indicaciones del asistente de instalación:
   a. Acepte el acuerdo de licencia.
   b. Revise las notas de la versión.
   c. Revise la lista de software incluido en la actualización.

   Al finalizar la actualización, el software de control se reinicia automáticamente.

NOTA
Si se incluye una actualización del firmware, se debe reiniciar automáticamente el sistema después de que el firmware se haya actualizado.

Actualización manual de software

1. Descargue el instalador del paquete de software (System Suite) del sitio web de Illumina y guárdelo en una ubicación de red.
   De manera alternativa, copie el archivo de instalación del software en una unidad USB portátil.
2. Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
3. Seleccione **Software Update** (Actualización del software).
4. Seleccione **Manually install the update from the following location** (Instalar manualmente la actualización desde la siguiente ubicación).

5 Seleccione **Browse** (Examinar) para ir a la ubicación del archivo de instalación del software y, a continuación, seleccione **Update** (Actualizar).

6 Siga las indicaciones del asistente de instalación:
   a Acepte el acuerdo de licencia.
   b Revise las notas de la versión.
   c Revise la lista de software incluido en la actualización.

Al finalizar la actualización, el software de control se reinicia automáticamente.

NOTA
Si se incluye una actualización del firmware, se debe reiniciar automáticamente el sistema después de que el firmware se haya actualizado.

Apagado del instrumento

1. Seleccione **Manage Instrument** (Administrar instrumento).
2. Seleccione **System Power Options** (Opciones de alimentación del sistema).
3. Seleccione **Shut Down** (Apagar).
   El comando Shut Down (Apagar) cierra el software de forma segura y apaga la alimentación del instrumento. Espere al menos 60 segundos antes de volver a encender el instrumento.

PRECAUCIÓN

No cambie la posición del instrumento. Si lo mueve de forma incorrecta, la alineación óptica podría verse afectada y comprometer la integridad de los datos. Si debe cambiar la posición del instrumento, póngase en contacto con su representante de Illumina.

Solución de problemas

Capítulo 4

Introducción 46
Archivos de solución de problemas 47
Live Help 49
Solución de errores de comprobación automática 50
Contenedor de reactivos usados lleno 52
Flujo de trabajo de la rehibridación 53
Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas 55
Comprobación del sistema 56
Mensaje de error de RAID 59

Introducción

Para cuestiones técnicas, visite las páginas de asistencia de NextSeq 500 en el sitio web de Illumina. Las páginas de asistencia proporcionan acceso a la documentación, las descargas y las preguntas frecuentes.

Inicie sesión en su cuenta de MyIllumina para acceder a los boletines de asistencia.

Si tiene problemas con la calidad o el rendimiento de los experimentos, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Consulte *Asistencia técnica* en la página 79.

Le recomendamos compartir un enlace para el resumen del experimento en BaseSpace con el servicio de asistencia técnica de Illumina para facilitar la solución de problemas.

Archivos de solución de problemas

Es posible que el representante del servicio de asistencia técnica de Illumina le solicite que proporcione copias de archivos específicos del experimento o específicos de la lectura para solucionar problemas. Normalmente, se utilizan los archivos siguientes para solucionar problemas.

Archivo clave	Carpeta	Descripción
Archivo de información del experimento (RunInfo.xml)	Carpeta raíz	Contiene la siguiente información: • Nombre del experimento • Número de ciclos del experimento • Número de ciclos de cada lectura • Si la lectura es una lectura indexada • Número de sectores y placas de la celda de flujo
Archivo de parámetros del experimento (RunParameters.xml)	Carpeta raíz	Contiene información sobre los parámetros del experimento y los componentes del experimento. La información incluye el RFID, el número de serie, el número de referencia y la fecha de caducidad.
Archivo de configuración de RTA (RTAConfiguration.xml)	Data\Intensities	Contiene los parámetros de configuración de RTA para el experimento. El archivo RTAConfiguration.xml se crea al inicio del experimento.
Archivos InterOp (*.bin)	InterOp	Archivos de informes binarios utilizados por el visor del análisis de secuenciación. Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento.
Archivos de registro	Registros	Los archivos de registro describen cada paso llevado a cabo por el instrumento en cada ciclo y enumeran las versiones de software y firmware utilizadas con el experimento. El archivo llamado [Nombre del instrumento]_CurrentHardware.csv muestra los números de serie de los componentes del instrumento.
Archivos de registro de errores (*ErrorLog*.txt)	Registros de RTA	Registro de errores de RTA. Los archivos de registro de errores se actualizan siempre que se produce un error.
Archivos de registro global (*GlobalLog*.tsv)	Registros de RTA	Registro de todos los eventos de RTA. Los archivos de registro global se actualizan durante el experimento.
Archivos de registro de carril (*LaneLog*.txt)	Registros de RTA	Registro de eventos de procesamiento de RTA. Los archivos de registro de carril se actualizan durante el experimento.

Errores de RTA

Para solucionar los errores de RTA, compruebe primero el registro de errores de RTA que se almacena en la carpeta RTALogs. Este archivo no está presente como experimento realizado con éxito. Incluya el registro de errores al notificar los problemas al servicio de asistencia técnica de Illumina.

Live Help

La función Live Help conecta el instrumento directamente con el personal del servicio de asistencia técnica de Illumina para resolver problemas. Con su permiso, un representante del servicio de asistencia técnica de Illumina podrá visualizar la pantalla y compartir el control del instrumento. Usted tendrá el control principal y podrá cerrar la sesión de uso compartido de la pantalla en cualquier momento.

El instrumento debe estar conectado a una red con acceso a Internet para que se active la opción Live Help.

Share Your Desktop

1. En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **Shutdown Options** (Opciones de apagado).
2. En la pantalla Shutdown Options (Opciones de apagado), seleccione **Exit to Windows** (Salir a Windows).
3. Abra un navegador y vaya a support.illumina.com/share_desktop.html. El cuadro de diálogo de Share Your Desktop (Compartir escritorio) se abre.
4. Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina para obtener un código de acceso único.
5. Introduzca su código de acceso único en el campo Access Code (Código de acceso).

   Figura 26 Campo de código de acceso de Share Your Desktop (Compartir escritorio)

Share Your Desktop
Please fill out the fields below.
Name:
Company:
Type the code you received from your Representative and click Continue to proceed.
CONTINUE

6. Haga clic en **Continue** (Continuar). Se inicia la sesión de uso compartido de la pantalla.
7. Para finalizar la sesión de uso compartido de la pantalla, seleccione **Home** (Inicio).

Solución de errores de comprobación automática

Si se producen errores durante la comprobación automática, utilice las siguientes medidas recomendadas para resolver el error.

Si falla una comprobación previa al experimento, la identificación de radiofrecuencia (RFID, por sus siglas en inglés) del cartucho de reactivo no está bloqueada y puede usarse en un experimento posterior. Sin embargo, la RFID se bloquea después de que se hayan perforado los cierres metálicos.

Comprobaciones del sistema	Acción recomendada
Doors Closed (Puertas cerradas)	Asegúrese de que las puertas del compartimento estén cerradas.
Consumables Loaded (Consumibles cargados)	Los sensores de los consumibles no registran debidamente. Asegúrese de que todos los consumibles estén bien cargados. En las pantallas de configuración del experimento, seleccione **Back** (Atrás) para volver al paso de carga y repita la configuración del experimento.
Required Software (Software necesario)	Faltan los componentes críticos del software. Lleve a cabo una actualización manual del software para restablecer todos los componentes del software.
Instrument Disk Space (Espacio de disco del instrumento)	El disco duro del instrumento no tiene suficiente espacio para ejecutar un experimento. Es posible que no se hayan transferido los datos de un experimento anterior. Borre los datos del experimento del disco duro del instrumento.
Network Connection (Conexión de red)	La conexión de red se ha interrumpido. Compruebe el estado de la red y la conexión de red física.
Network Disk Space (Espacio de disco de la red)	La cuenta de BaseSpace está llena o el servidor de red está lleno.

Temperature (Temperatura)	Acción recomendada
Temperature (Temperatura)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Temperature Sensors (Sensores de temperatura)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Fans (Ventiladores)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Sistema de adquisición de imágenes	Acción recomendada
Imaging Limits (Límites de adquisición de imágenes)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Sistema de adquisición de imágenes	Acción recomendada
Z Steps-and-Settle (Z Steps-and-Settle)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Bit Error Rate (Tasa de errores de bits)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Flow Cell Registration (Registro de la celda de flujo)	Es posible que la celda de flujo no esté bien colocada. • En las pantallas de configuración del experimento, seleccione **Back** (Atrás) para volver al paso de la celda de flujo. La puerta del compartimento de adquisición de imágenes se abre. • Descargue y vuelva a cargar la celda de flujo para asegurarse de que está bien colocada.

Administración de reactivos	Acción recomendada
Valve Response (Respuesta de la válvula)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Pump (Bomba)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Buffer Mechanism (Mecanismo de los tampones)	Póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.
Spent Reagents Empty (Reactivos usados vaciados)	Vacíe el contenedor de reactivos usados y vuelva a cargar el contendor vacío.

Contenedor de reactivos usados lleno

Inicie siempre un experimento con un contenedor de reactivos usados vacío.

Si inicia un experimento sin haber vaciado el contenedor de reactivos usados, los sensores del sistema activan el software para detener el experimento si el contenedor está lleno. Los sensores del sistema no pueden detener un experimento durante la generación de grupos, la resíntesis "paired-end" o el lavado automático posterior al experimento.

Cuando se detiene el experimento, se abre un cuadro de diálogo con opciones para levantar los dispensadores y vaciar el contenedor lleno.

Vaciado del contenedor de reactivos usados

1. Seleccione **Raise Sippers** (Levantar los dispensadores).
2. Extraiga el contenedor de reactivos usados y deseche los contenidos de manera adecuada.
3. Vuelva a colocar el contenedor vacío en el compartimento de tampones.
4. Seleccione **Continue** (Continuar). El experimento se reanuda automáticamente.

Flujo de trabajo de la rehibridación

Es posible que se deba realizar un experimento de rehibridación si los criterios de medición generados durante los primeros ciclos muestran intensidades por debajo de 2500. Algunas bibliotecas de baja diversidad pueden mostrar intensidades por debajo de 1000, lo que es previsible y no puede resolverse con la rehibridación.

NOTA
El comando End Run (Finalizar experimento) es definitivo. No es posible reanudar el experimento, no se pueden reutilizar los consumibles del experimento y tampoco se guardan los datos de secuenciación del experimento.

Cuando finalice un experimento, el software realizará los pasos siguientes antes de que el experimento finalice:

- Coloca la celda de flujo en un estado seguro.
- Desbloquea la RFID de la celda de flujo para un experimento posterior.
- Asigna una fecha de caducidad de rehibridación a la celda de flujo.
- Escribe los registros del experimento para los ciclos realizados. Suele producirse un retraso.
- Omite el lavado automático posterior al experimento.

Cuando inicie un experimento de rehibridación, el software realizará los pasos siguientes para llevar a cabo el experimento:

- Crea una carpeta de experimento en función de un nombre único del experimento.
- Comprueba que la fecha de rehibridación de la celda de flujo no haya caducado.
- Ceba los reactivos. Suele producirse un retraso.
- Se salta el paso de generación de grupos.
- Elimina el cebador de Lectura 1 anterior.
- Hibrida un cebador de Lectura 1 nuevo.
- Continúa con la Lectura 1 y el resto del experimento según los parámetros del experimento especificados.

Puntos para finalizar un experimento de rehibridación

La posterior rehibridación solo es posible si finaliza el experimento en los puntos siguientes:

- **Después del ciclo 5**: Las intensidades aparecen tras el registro de plantilla, que exige los primeros cinco ciclos de secuenciación. Aunque es seguro finalizar un experimento después del ciclo 1, se recomienda finalizarlo después del ciclo 5. No finalice un experimento durante la generación de grupos.
- **Lectura 1 o Lectura de índice 1**: Finalice el experimento ***antes*** de iniciar la resíntesis "paired-end". La celda de flujo no se puede guardar para la posterior rehibridación una vez iniciada la resíntesis "paired-end".

Consumibles necesarios

Un experimento de rehibridación requiere un cartucho de reactivo y cartucho de tampones NextSeq nuevo, independientemente de cuándo se detuvo el experimento.

Finalización del experimento actual

1 Seleccione **End Run** (Finalizar experimento). Cuando se le pregunte si quiere confirmar el comando, seleccione **Yes** (Sí).

2 Cuando se le pregunte si quiere guardar la celda de flujo, seleccione **Yes** (Sí). Tenga que cuenta la fecha de caducidad para la rehibridación.

3 Retire la celda de flujo guardada y resérvela a una temperatura de entre 2 y 8 °C hasta que esté listo para configurar el experimento de rehibridación.

NOTA
Puede almacenar la celda de flujo hasta siete días a una temperatura de entre 2 y 8 °C en el estuche protector de plástico ***sin*** el paquete desecante. Para obtener los mejores resultados, rehibride la celda de flujo guardada en tres días.

Realización de un lavado manual

1 En la pantalla Home (Inicio), seleccione **Perform Wash** (Realizar lavado).

2 En la pantalla Wash Selection (Selección de lavado), seleccione **Manual Post-Run Wash** (Lavado manual posterior al experimento). Consulte *Realización de un lavado manual* en la página 39.

NOTA
Si no ha extraído el cartucho de reactivo y el cartucho de tampones del experimento detenido, puede utilizarlos para el lavado manual. De lo contrario, realice el lavado manual con el cartucho de lavado de reactivo y el cartucho de lavado de tampones.

Configuración de un experimento nuevo en la ficha BaseSpace Prep

Si el instrumento está configurado para BaseSpace o BaseSpace Onsite, configure un experimento nuevo en la ficha Prep (Preparación) con los mismos parámetros que el experimento original.

SUGERENCIA
Haga clic en la ficha Pools (Grupos), seleccione el ID de grupo adecuado para conservar los parámetros del experimento anterior y, a continuación, asigne un nombre único al experimento nuevo.

Configuración de un experimento en el instrumento

1 Prepare un cartucho de reactivo nuevo.

2 Si se ha almacenado la celda de flujo guardada, deje que alcance la temperatura ambiente (15-30 minutos).

3 Cargue la celda de flujo guardada.

4 Extraiga el contenedor de reactivos usados y deseche el contenido de manera adecuada y, a continuación, vuelva a cargar el contenedor vacío.

5 Cargue el nuevo cartucho de tampones y el nuevo cartucho de reactivo.

6 En la pantalla Run Setup (Configuración del experimento), seleccione una de las siguientes opciones:
- **BaseSpace o BaseSpace Onsite:** Seleccione el experimento y confirme los parámetros del mismo.
- **Standalone** (Independiente): Introduzca el nombre del experimento y especifique los mismos parámetros que en el experimento original.

7 Seleccione **Next** (Siguiente) para continuar con la comprobación previa al experimento e inicie el experimento.

Fórmulas personalizadas y carpetas de fórmulas

No modifique las fórmulas originales. Realice siempre una copia de la fórmula original con un nombre nuevo. Si se modifica la fórmula original, el actualizador del software ya no podrá reconocer la fórmula en próximas actualizaciones y no se instalarán las versiones más recientes.

Almacene las fórmulas personalizadas en la carpeta de fórmulas apropiada. Las carpetas de fórmulas se organizan como se indica a continuación:

- **Custom**
  - **High**: Fórmulas personalizadas que se utilizan con un kit de rendimiento elevado.
  - **Mid**: Fórmulas personalizadas que se utilizan con un kit de rendimiento medio.
- **High**: Fórmulas originales que se utilizan con un kit de rendimiento elevado.
- **Mid**: Fórmulas originales que se utilizan con un kit de rendimiento medio.
- **Wash:** Contiene la fórmula de lavado manual.

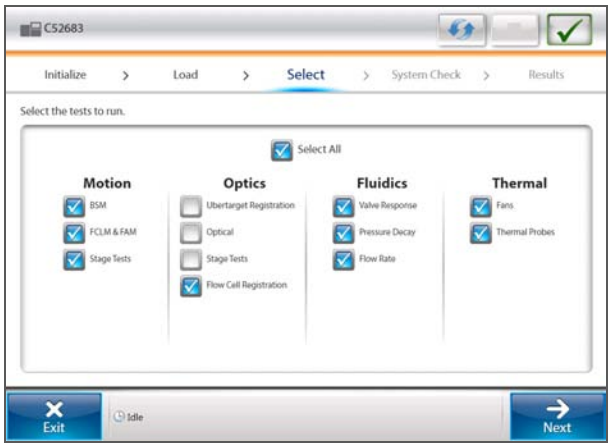
Comprobación del sistema

No se precisa ejecutar ninguna comprobación del sistema para el funcionamiento normal o el mantenimiento del instrumento. No obstante, un representante del servicio de asistencia técnica de Illumina puede solicitarle que ejecute una comprobación del sistema con el fin de resolver problemas.

NOTA
Si se debe realizar un lavado del instrumento, realícelo antes de iniciar una comprobación del sistema.

Al iniciar una comprobación del sistema de forma automática se cierra el software de control y se inicia el software de servicio de NextSeq (NSS, por sus siglas en inglés). El software de servicio se inicia y se abre la pantalla Load (Cargar), que está configurada para utilizar la opción de carga avanzada.

Figura 27 Comprobaciones del sistema disponibles



Las casillas de verificación desactivadas en la pantalla Select (Selección) indica pruebas que requieren la asistencia de un representante de campo de Illumina.

Realización de una comprobación del sistema

1. En la pantalla Manage Instrument (Administrar instrumento), seleccione **System Check** (Comprobación del sistema). Cuando se solicite cerrar el software de control, seleccione **Yes** (Sí).
2. Cargue los consumibles como se describe a continuación:
   a. Si todavía no hay ninguna celda de flujo usada en el instrumento, cargue una celda de flujo usada.
   b. Vacíe el contenedor de reactivos usados y vuelva a colocarlo en el instrumento.
   c. Cargue el cartucho de lavado de tampones que contienen 120 ml de agua de laboratorio en el depósito central.
   d. Cargue el cartucho de lavado de reactivos. Asegúrese de que el cartucho de lavado de reactivos está limpio y vacío.
3. Seleccione **Load** (Cargar). El software mueve la celda de flujo y el cartucho de lavado de reactivos a su posición. Seleccione **Next** (Siguiente).
4. Seleccione **Next** (Siguiente). Se inicia la comprobación del sistema.

5 [Opcional] Cuando haya finalizado la comprobación del sistema, seleccione **View** (Visualizar) junto al nombre de comprobación para visualizar los valores asociados a cada comprobación.

6 Seleccione **Next** (Siguiente). Se abre el informe de comprobación del sistema.

7 Seleccione **Save** (Guardar) para guardar el informe en un archivo comprimido. Vaya a una ubicación de red para guardar el archivo.

8 Cuando termine, seleccione **Exit** (Salir).

9 Cuando se solicite cerrar el software de servicio y reiniciar el software de control, seleccione **Yes** (Sí). El software de control se reinicia automáticamente.

Comprobaciones de movimiento

Comprobación del sistema	Descripción
BSM (BSM)	Comprueba la mejora y la distancia del mecanismo de tubos para botellas (BSM) para confirmar que el módulo funciona correctamente.
FCLM & FAM (FCLM y FAM)	Comprueba la mejora y la distancia del mecanismo de carga de la celda de flujo (FCLM) y el módulo de automatización de fluidos (FAM) para confirmar que los módulos funcionan correctamente.
Stage Tests (Pruebas de platina)	Comprueba los límites de desplazamiento y el rendimiento de la platina XY y las seis platinas Z, una para cada cámara.

Comprobación del sistema óptico

Comprobación del sistema	Descripción
Flow Cell Registration (Registro de la celda de flujo)	Mide la inclinación de la celda de flujo en un plano óptico, comprueba la función de la cámara, comprueba el módulo de adquisición de imágenes y verifica el registro de la celda de flujo en la posición correcta de adquisición de imágenes.

Comprobaciones de la fluídica

Comprobación del sistema	Descripción
Valve Response (Respuesta de la válvula)	Comprueba la precisión de los movimientos de la válvula y la bomba, así como la amplitud de movimiento de la jeringa de la bomba.
Pressure Decay (Caída de la presión)	Comprueba la tasa de fuga de un sistema de fluídica con cierre, que confirma que la celda de flujo está bien montada en la posición de secuenciación.
Flow Rate (Velocidad de flujo)	Comprueba el funcionamiento de los sensores de burbujas, que se utilizan para detectar la presencia de aire en los conductos de reactivo. Mide la velocidad de flujo para detectar oclusiones o fugas.

Comprobaciones térmicas

Comprobación del sistema	Descripción
Fans (Ventiladores)	Comprueba la velocidad de los ventiladores del sistema en pulsos por minuto (PPM) para confirmar que los ventiladores funcionan. Los ventiladores que no funcionan devuelven un valor negativo.
Thermal Probes (Sondas térmicas)	Comprueba la temperatura media de cada sensor térmico. Los sensores térmicos que no funcionan devuelven un valor negativo.

Mensaje de error de RAID

El ordenador del NextSeq está equipado con dos discos duros. Si un disco duro empieza a fallar, el sistema genera un mensaje de error de RAID y le sugiere que se ponga en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina. Normalmente, se debe sustituir el disco duro.

Puede proceder con los pasos de configuración del experimento y el funcionamiento normal. El propósito del mensaje es planificar los trabajos de mantenimiento de forma anticipada para evitar interrupciones en el funcionamiento normal del instrumento. Para continuar, seleccione **Acknowledge** (Aceptar) y, a continuación, **Close** (Cerrar).

Análisis en tiempo real

Apéndice A

Introducción 62
Descripción general de RTA v2 63
Flujo de trabajo del análisis en tiempo real 65
Archivos de resultados de secuenciación 68
Placas de la celda de flujo 70
Estructura de carpetas de resultados de secuenciación 73

Introducción

El software de análisis en tiempo real integrado lleva a cabo un análisis de datos en tiempo real integrado en el instrumento durante el experimento de secuenciación, que incluye el análisis de imágenes y llamadas de bases, además de ahorrar un tiempo muy valioso en los análisis sucesivos. El NextSeq utiliza una nueva implementación del software de análisis en tiempo real (RTA) llamado RTA v2, que incluye diferencias importantes en materia de arquitectura y funciones.

RTA v2 introduce las diferencias siguientes:

- Todos los procesos se llevan a cabo en memoria para maximizar la velocidad de procesamiento.
- Los archivos de configuración, los formatos de los archivos de resultados y el flujo de trabajo de procesamiento difieren de las implementaciones de RTA anteriores.
- Los parámetros del archivo de configuración utilizados con implementaciones de RTA anteriores no son compatibles con RTA v2.
- Si se detiene el procesamiento, RTA v2 no reanuda ni continúa con el procesamiento. No se puede reiniciar el software durante un experimento de secuenciación.

Descripción general de RTA v2

RTA v2 se ejecuta en el ordenador del instrumento y realiza análisis durante el experimento. RTA v2 extrae intensidades de imágenes, realiza llamadas de bases y asigna una puntuación de calidad a la llamada.

A diferencia de las versiones anteriores de RTA, RTA v2 y Software de control de NextSeq (NCS) se comunican a través de una interfaz HTTP web y archivos de memoria compartidos. RTA v2 almacena toda la información de procesamiento en la memoria para acelerar el procesamiento lo máximo posible. Puesto que el procesamiento se realiza en memoria, ***RTA v2 no puede reiniciarse tras detener un experimento***.

Entradas de RTA v2

RTA v2 requiere las siguientes entradas para el procesamiento:

- Las imágenes de las placas contenidas en la memoria del sistema local.
- RunInfo.xml, que se genera de forma automática al comienzo del experimento y proporciona el nombre del experimento, el número de ciclos, el dato de si se ha indexado una lectura y el número de placas en la celda de flujo.
- RTA.exe.config, que es un archivo de configuración de software en formato XML.

RTA v2 recibe comandos del software de control acerca de la ubicación de RunInfo.xml y acerca de si se ha especificado una carpeta de resultados opcional.

Archivos de resultados de RTA v2

Las imágenes de cada canal se transfieren en memoria como placas. Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como el campo de visión por la cámara. A partir de estas imágenes, el software produce un resultado en forma de conjunto de archivos de filtro y archivos de llamadas de bases clasificadas por calidad. Todos los demás archivos admiten archivos de resultados.

Tipo de archivo	Descripción
Archivos de llamadas de bases	Cada placa analizada se incluye en un archivo de llamadas de bases (*.bcl) agregado para cada carril y para cada ciclo. El archivo de llamadas de bases agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad asociada para cada grupo en ese carril.
Archivos de filtro	Cada placa produce información de filtro que se agrega a un archivo de filtro (*.filter) para cada carril. El archivo de filtro especifica si un grupo ha superado los filtros.
Archivos de ubicación de grupos	Los archivos de ubicación de grupos (*.locs) contienen las coordenadas X e Y para cada grupo en una placa. Durante la generación de plantillas, se genera un archivo de ubicación de grupos para cada carril.
Archivo de índice de llamadas de bases	Se produce un archivo de índice de llamada de bases (*.bci) para cada carril con el fin de preservar la información de placa original. El archivo de índice contiene un par de valores para cada placa, que son el número de placa y el número de grupos para esa placa.

Los archivos de resultados se utilizan para los análisis secundarios en BaseSpace. De manera alternativa, utilice el software de conversión bcl2fastq para la conversión FASTQ y soluciones de análisis de terceros. Los archivos de NextSeq requieren bcl2fastq v2.0 o versiones posteriores. Para obtener la última versión de bcl2fastq, visite la página de descargas de NextSeq en el sitio web de Illumina.

RTA v2 proporciona criterios de medición en tiempo real de experimentos de calidad guardados como archivos InterOp. Los archivos InterOp son archivos de resultados binarios que contienen criterios de medición relacionados con placas, ciclos y lecturas y son necesarios para la visualización de criterios de medición en tiempo real con el visor del análisis de secuenciación (SAV). Para obtener la última versión de SAV, visite lapágina de descargas de SAV en el sitio web de Illumina.

Grupos que superan el filtro

Durante el experimento, RTA v2 filtra datos sin procesar para eliminar las lecturas que no satisfagan el umbral de calidad de datos. El solapamiento y los grupos de baja calidad se eliminan.

En el caso de análisis de dos canales, RTA v2 utiliza un sistema basado en la población para determinar la castidad de una llamada de bases. Los grupos que superan el filtro (PF), si no hay más de una llamada de bases en los primeros 25 ciclos, tienen un valor de castidad inferior a 0,63. Los grupos que no superan el filtro no son llamadas de bases.

Gestión de errores de RTA v2

RTA v2 crea archivos de registro y los escribe a la carpeta RTALogs. Los errores se registran en un archivo con formato de archivo *.tsv.

Los siguientes archivos de registro y error se transfieren al destino de salida final tras completar el procesamiento:

- *GlobalLog*.tsv resume los eventos importantes del experimento.
- *LaneNLog*.tsv incluye los eventos de procesamiento para cada carril.
- *Error*.tsv incluye los errores que se hayan producido durante un experimento.
- *WarningLog*.tsv enumera las advertencias que se han producido durante un experimento.

Flujo de trabajo del análisis en tiempo real

El flujo de trabajo del análisis en tiempo real incluye los pasos siguientes:

- **Generación de plantillas:** Para definir las ubicaciones de grupos.
- **Registro y extracción de intensidad:** Para alinear posiciones de grupos y determinar valores de intensidad.
- **Corrección empírica de hebras:** Para corregir los efectos de la hebra retrasada y la hebra adelantada.
- **Llamada de bases:** Para determinar una llamada de bases para cada grupo.
- **Puntuación de calidad:** Para asignar una puntuación de calidad a cada llamada de bases.

Generación de plantillas

El primer paso en el flujo de trabajo del análisis en tiempo real es la generación de plantillas, que define la posición de cada grupo en una placa mediante el uso de las coordenadas X e Y.

La generación de plantillas requiere datos de imagen de los primeros cinco ciclos del experimento. Tras el último ciclo de la plantilla para la adquisición de imágenes de una placa, se genera la plantilla.

NOTA

Para detectar un grupo durante la generación de plantillas, debe haber como mínimo una base distinta de G en los primeros **cinco** ciclos. Para los secuenciadores de índice, RTA v2 precisa como mínimo una base distinta de G en los primeros **dos** ciclos.

La plantilla se utiliza como referencia para el siguiente paso de registro y extracción de intensidad. Las posiciones de los grupos para el conjunto de la celda de flujo se escriben en archivos de ubicación de grupos (*.locs), uno para cada carril.

Registro y extracción de intensidad

El registro y la extracción de intensidad comienza después de la generación de plantillas.

- El registro alinea imágenes producidas durante cada ciclo de imágenes posterior en relación con la plantilla.
- La extracción de intensidad determina un valor de intensidad para cada grupo de la plantilla para una imagen determinada.

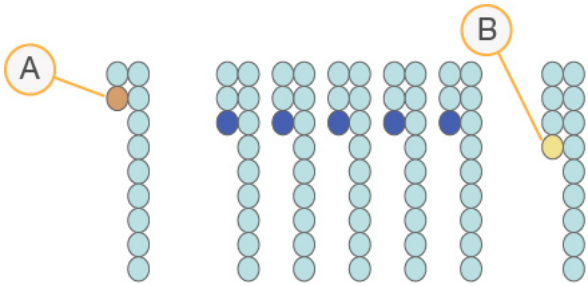
Si se produce un error en el registro de cualquier imagen en un ciclo, no se generará ninguna llamada de bases para esa placa en ese ciclo. Utilice el software del visor del análisis de secuenciación (SAV) para examinar las imágenes en miniatura e identificar las imágenes que no se han podido registrar.

Corrección empírica de hebras

Durante la reacción de secuenciación, cada cadena de ADN de un grupo se amplía en una base por cada ciclo. La hebra retrasada y la hebra adelantada se producen cuando una cadena queda fuera de la fase en relación con el ciclo de incorporación actual.

- La hebra retrasada se produce cuando una base se atrasa.
- La hebra adelantada se produce cuando una base se avanza.

Figura 28 Hebra retrasada y hebra adelantada



A Lectura con una base con hebra retrasada
B Lectura con una base con hebra adelantada

RTA v2 corrige los efectos de la hebra retrasada y la hebra adelantada mediante el uso del algoritmo de corrección empírica de hebras que maximiza la castidad acumulativa de los datos en cada ciclo durante el experimento. RTA v2 no aplica correcciones a las lecturas de índice.

Llamada de bases

La llamada de bases determina una base (A, C, G o T) para cada grupo de una placa determinada en un ciclo específico. El NextSeq 500 utiliza la secuenciación de dos canales, que precisa solo dos imágenes para codificar los datos para cuatro bases de ADN, un canal rojo y un canal verde.

Las intensidades extraídas de una imagen en comparación con otra imagen redundan en cuatro poblaciones distintas, cada una de las cuales corresponde a un nucleótido. El proceso de llamada de bases determina a qué población pertenece cada grupo.

Figura 29 Intensidades de grupos en un diagrama de dispersión

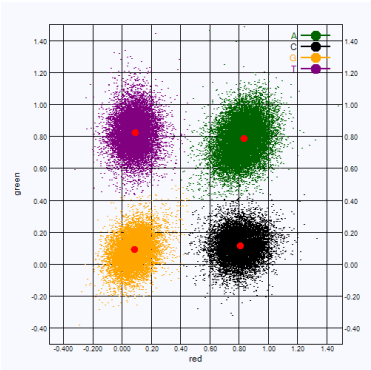


Tabla 1 Llamadas de bases en secuenciación de dos canales

Base	Canal rojo	Canal verde	Resultado
A	1 (encendido)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad en el canal rojo y verde.
C	1 (encendido)	0 (apagado)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal rojo.
G	0 (apagado)	0 (apagado)	Los grupos que no presentan intensidad en una ubicación de grupos conocida.

Base	Canal rojo	Canal verde	Resultado
T	0 (apagado)	1 (encendido)	Los grupos que presentan intensidad solo en el canal verde.

Puntuación de calidad

Una puntuación de calidad (puntuación Q) es una predicción de la probabilidad de obtener una llamada de bases incorrecta. Una puntuación Q superior implica que una llamada de bases es más fiable y, por lo tanto, la probabilidad de que sea correcta es superior.

La puntuación Q sirve como una forma concisa de comunicar probabilidades de error pequeñas. Las puntuaciones de calidad se representan como QXX, donde XX es la puntuación. En la siguiente tabla figura la relación entre la puntuación de calidad y la probabilidad de error.

Puntuación Q, Q(X)	Probabilidad de error
Q40	0,0001 (1 en 10 000)
Q30	0,001 (1 en 1000)
Q20	0,01 (1 en 100)
Q10	0,1 (1 en 10)

La puntuación de calidad calcula un conjunto de predictores para cada llamada de bases y, a continuación, utiliza los valores de los predictores para determinar la puntuación Q en la tabla de calidad. Las tablas de calidad se crean para proporcionar predicciones de calidad con una precisión óptima para experimentos generados mediante una configuración de plataforma de secuenciación y versión de química específicas.

Tras determinar la puntuación Q, los resultados se registran en los archivos de llamadas de bases (*.bcl). Para obtener más información, consulte *Archivos de resultados de secuenciación* en la página 68.

Archivos de resultados de secuenciación

Tipo de archivo	Descripción del archivo, ubicación y nombre
Archivos de llamadas de bases	Cada placa analizada se incluye en un archivo de llamadas de bases, agregado en un archivo para cada carril y para cada ciclo. El archivo agregado contiene la llamada de bases y la puntuación de calidad codificada para cada grupo en ese carril. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. [Ciclo].bcl.bgzf, donde [Ciclo] representa el número de ciclo en cuatro dígitos. Los archivos de llamadas de bases se comprimen mediante el uso de la compresión de bloques gzip.
Archivo de índice de llamadas de bases	Para cada carril, un archivo de índice binario recopila la información de placas original en un par de valores para cada placa, que son el número de placa y el número de grupos para la placa. Los archivos de índice de llamadas de bases se generan al crear por primera vez un archivo de llamadas de bases para ese carril. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. s_[Carril].bci
Archivos de ubicación de grupos	Para cada placa, las coordenadas X e Y para cada grupo se agregan a un archivo de ubicación de grupos para cada carril. Los archivos de ubicación de grupos son el resultado de la generación de plantillas. Data\Intensities\L00[X]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. s_[carril].locs
Archivos de filtro	El archivo de filtro especifica si un grupo ha superado los filtros. La información de filtro se agrega a un archivo de filtro para cada carril y lectura. Los archivos de filtro se generan en el ciclo 26 mediante el uso de 25 ciclos de datos. Data\Intensities\BaseCalls\L00[X]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril. s_[carril].filter
Archivos InterOp	Archivos de informes binarios utilizados por el visor del análisis de secuenciación (SAV). Los archivos InterOp se actualizan durante el experimento. Carpeta InterOp
Archivo de configuración de RTA	Creado al inicio del experimento, el archivo de configuración de RTA contiene los parámetros de configuración del experimento. [Carpeta raíz], RTAConfiguration.xml
Archivo de información del experimento	Indica el nombre del experimento, el número de ciclos de cada lectura, si la lectura es una lectura indexada, y el número de sectores y placas de la celda de flujo. El archivo de información del experimento se crea al inicio del experimento. [Carpeta raíz], RunInfo.xml

Tipo de archivo	Descripción del archivo, ubicación y nombre
Archivos de vistas en miniatura	Una imagen en miniatura para cada canal de color (rojo y verde) para las placas 1, 6 y 12 de todas las cámaras, superficies superiores e inferiores en cada ciclo durante la adquisición de imágenes. Thumbnail_Images\L00[X]\C[X.1]: Los archivos se almacenan en una carpeta para cada carril y una subcarpeta para cada ciclo. s_[carril]_[placa]_[canal].jpg: En el nombre de archivo, la placa se representa con un número de cinco dígitos que indica la superficie, el sector, la cámara y la placa. Si desea obtener más información, consulte *Numeración de placas* en la página 72 y *Asignación de nombre a imágenes en miniatura* en la página 72.

Placas de la celda de flujo

Las placas son pequeñas áreas de adquisición de imágenes en la celda de flujo definidas como el campo de visión por la cámara. El número total de placas depende del número de imágenes de carriles, sectores y superficies adquiridas en la celda de flujo, y del funcionamiento conjunto de las cámaras para la obtención de las imágenes.

- Las celdas de flujo de rendimiento elevado tienen un total de 864 placas.
- Las celdas de flujo de rendimiento medio tienen un total de 288 placas.

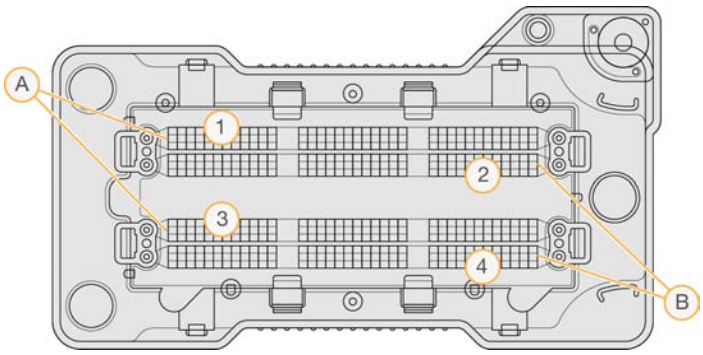
Tabla 2 Placas de la celda de flujo

Componente de la celda de flujo	Rendimiento elevado	Rendimiento medio	Descripción
Carriles	4	4	Un carril es un canal físico con puertos de entrada y salida especializados.
Superficies	2	2	La imagen de la celda de flujo se adquiere en dos superficies, la superior y la inferior. Primero se adquiere la imagen de la superficie superior de una placa y, a continuación, la imagen de la superficie inferior de la misma placa antes de avanzar a la placa siguiente.
Sectores por carril	3	1	Un sector es una columna de placas en un carril.
Segmentos de cámara	3	3	El instrumento utiliza seis cámaras para la adquisición de imágenes de la celda de flujo en tres segmentos por carril.
Placas por sector por segmento de cámara	12	12	Una placa es el área de la celda de flujo que la cámara ve como una imagen.
Total de imágenes de placas	864	288	El número total de placas equivale a carriles × superficies × sectores × segmentos de cámara × placas por sector por segmento.

Numeración de carriles

Las imágenes de los carriles 1 y 3, conocidos como par de carriles A, se adquieren al mismo tiempo. Las imágenes de los carriles 2 y 4, conocidos como par de carriles B, se adquieren tras la adquisición de las imágenes del par de carriles A.

Figura 30 Numeración de carriles

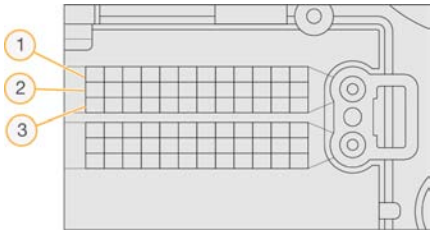


A Par de carriles A: carriles 1 y 3
B Par de carriles B: carriles 2 y 4

Numeración de sectores

Las imágenes de cada carril se adquieren en tres sectores. Los sectores están numerados del 1 al 3 para las celdas de flujo de rendimiento elevado.

Figura 31 Numeración de sectores

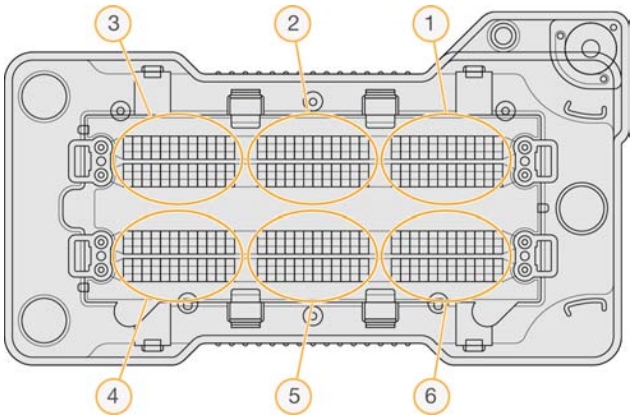


Numeración de cámaras

El NextSeq 500 utiliza seis cámaras para la adquisición de imágenes de la celda de flujo.

Las cámaras están numeradas del 1 al 6. Las cámaras del 1 al 3 realizan la adquisición de imágenes del carril 1. Las cámaras del 4 al 6 realizan la adquisición de imágenes del carril 3. Tras la adquisición de imágenes de los carriles 1 y 3, el módulo de adquisición de imágenes se desplaza sobre el eje X para la adquisición de imágenes de los carriles 2 y 4.

Figura 32 Numeración de cámaras y segmentos

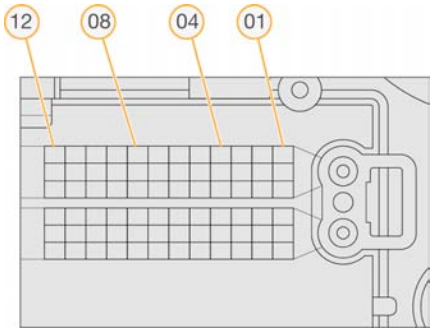


(Celda de flujo de rendimiento elevado)

Numeración de placas

Hay 12 placas en cada sector de cada segmento de cámara. Las placas están numeradas del 01 al 12, con independencia del número de sector o segmento de cámara, y se representan en dos dígitos.

Figura 33 Numeración de placas



El número de placa completo incluye cinco dígitos para la representación de la ubicación, tal y como se indica a continuación:

- **Superficie:** 1 representa la superficie superior y 2 representa la superficie inferior.
- **Sector:** 1, 2 o 3
- **Cámara:** 1, 2, 3, 4, 5 o 6
- **Placa:** 01, 02, 03, 04, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 o 12

Ejemplo: El número de placa 12508 indica la superficie superior, sector 2, cámara 5 y placa 8.

El número de placa completo de cinco dígitos se utiliza en el nombre de archivos de imágenes en miniatura y archivos empíricos de hebras. Si desea obtener más información, consulte *Archivos de resultados de secuenciación* en la página 68.

Asignación de nombre a imágenes en miniatura

Se genera una imagen en miniatura para cada canal de color (rojo y verde) para las placas 1, 6 y 12 de todas las cámaras, superficies superiores e inferiores en cada ciclo durante la adquisición de imágenes. Las imágenes en miniatura se generan en el formato de archivo JPG.

Se asigna a cada imagen un nombre con el número de placa tal y como indica la convención de nomenclatura siguiente, que siempre empieza por **s_**:

- **Carril:** 1, 2, 3 o 4
- **Placa:** Número de placa de cinco dígitos que indica la superficie, el sector, la cámara y la placa
- **Canal:**: Rojo o verde

Ejemplo: s_3_12512_green.jpg, que indica el carril 3, la superficie superior, el sector 2, la cámara 5, la placa 12 y el canal verde.

Estructura de carpetas de resultados de secuenciación

- **Data (Datos)**
  - **Intensities (Intensidades)**
    - **BaseCalls**
      - **L001:** Archivos de llamadas de bases para el carril 1, agregados en un archivo por ciclo.
      - **L002:** Archivos de llamadas de bases para el carril 2, agregados en un archivo por ciclo.
      - **L003:** Archivos de llamadas de bases para el carril 3, agregados en un archivo por ciclo.
      - **L004:** Archivos de llamadas de bases para el carril 4, agregados en un archivo por ciclo.
    - **L001**: Archivo *.locs agregado para el carril 1.
    - **L002**: Archivo *.locs agregado para el carril 2.
    - **L003**: Archivo *.locs agregado para el carril 3.
    - **L004**: Archivo *.locs agregado para el carril 4.
- **Images (Imágenes)**
  - **Focus (Enfoque)**
    - **L001:** Imágenes de enfoque para el carril 1.
    - **L002:** Imágenes de enfoque para el carril 2.
    - **L003:** Imágenes de enfoque para el carril 3.
    - **L004:** Imágenes de enfoque para el carril 4.
- **InterOp:** Archivos binarios utilizados por el visor del análisis de secuenciación (SAV).
- **Logs** (Registros): Archivos de registro que describen los pasos operativos.
- **Recipe** (Fórmula): Archivo de fórmulas específico del experimento con el nombre del ID del cartucho de reactivo.
- **RTALogs** (Registros de RTA): Archivos de registro que describen los pasos del análisis.
- **Thumbnail_Images** (Miniatura_Imágenes): Imágenes en miniatura para las placas 1, 6 y 12 en cada sector de cada ciclo.
- RTAComplete.xml
- RTAConfiguration.xml
- RunInfo.xml
- RunNotes.xml
- RunParameters.xml

Índice alfabético

A

acceso de Windows 13
actualización de software 42
administrar instrumento 11
  apagado 44
  configuración de BaseSpace 15
  configuración de IP y DNS 14
  configuración del análisis secundario 15
  enviar estado del instrumento 15
  nombre del ordenador 15
  personalización 16
adquisición de imágenes, secuenciación de dos canales 66
alertas de estado 12
análisis
  archivos de resultados 68
análisis principal
  hebra retrasada 65
  pureza de la señal 64
análisis secundario
  modo BaseSpace 15
  modo independiente 15
análisis, principal
  puntuación de calidad 67
apagado del instrumento 13, 44
archivos de filtros 68
archivos de llamadas de bases 68
archivos de registro
  GlobalLog 64
  LaneNLog 64
archivos de resultados 68
archivos de resultados, secuenciación 68
archivos InterOp 47, 68
archivos locs 68
asistencia técnica 79
ayuda
  documentación 3
  estado del instrumento 15
ayuda, Live Help 49
ayuda, técnica 79

B

barra de estado 4
BaseSpace 2
  configuración 15
  iconos de transferencia 35
  inicio de sesión 28
botón de encendido 9

C

cartucho de reactivo
  depósito n.º 28 40
  descripción 7
  preparación 24
cartucho de tampones 8, 30
celda de flujo
  adquisición de imágenes 71
  asignación de nombre de archivo de imagen 72
  descripción general 7
  inspección 25
  juntas del puerto 25
  limpieza 25
  numeración de carriles 70
  numeración de placas 72
  número de sector 71
  paquete 25
  pares de carriles 7
  pasadores de alineación 28
  placas 70
  rehibridación 53
  tipos 2
ciclos en una lectura 18
compartimento de adquisición de imágenes 4
compartimento de la celda de flujo 28
compartimento de reactivos 4
compartimento de tampones 4
compatibilidad
  celda de flujo, cartucho de reactivo 6
  seguimiento de RFID 6-7
componentes
  barra de estado 4
  compartimento de adquisición de imágenes 4
  compartimento de reactivos 4
  compartimento de tampones 4
comprobación del sistema 13, 56
comprobación previa al experimento 33
Configuración de BaseSpace 31
configuración de IP y DNS 14
configuración del experimento, opción avanzada 12
configuración independiente 32
consumibles
  agua de laboratorio 19
  cartucho de reactivo 7
  cartucho de tampones 8
  celda de flujo 7
  consumibles de lavado 40
  consumibles para lavado 39
  experimentos de secuenciación 19
  mantenimiento del instrumento 19
  proporcionados por Illumina 6
consumibles suministrados por el usuario 19
criterios de medición
  ciclos de densidad de grupos 34
  ciclos de intensidad 34
  llamada de bases 66
criterios de medición del experimento 34

D

directrices para el agua de laboratorio 19
documentación 3, 79
duración del experimento 17

E

errores de comprobación previa al experimento 50
errores y advertencias 12
  en archivos de registro 64
escala Phred 67

F

filtro de castidad 64
flujo de trabajo
  cartucho de reactivo 24
  cartucho de reactivos 30
  cartucho de tampones 30
  celda de flujo 28
  comprobación previa al experimento 33
  criterios de medición del experimento 34
  descripción general 23
  duración del experimento 17
  hipoclorito de sodio 40
  inicio de sesión de BaseSpace 28
  modo BaseSpace 31
  modo independiente 32
  opción de carga avanzada 12
  preparación de la celda de flujo 25
  puerta del compartimento de la celda de flujo 28
  reactivos usados 28
formación en línea 3
formamida, posición 6 31

G

generación de plantillas 65
grupos que superan el filtro 64

H

hebra adelantada 65
hebra retrasada 65
hipoclorito de sodio, lavado 40

I

iconos
  errores y advertencias 12
  estado 12
imágenes en miniatura 69
instrumento
  apagar 13
  botón de encendido 9
  inicio 9
  parámetros de configuración 14
intensidades 66
interruptor de alimentación 9

L

lavado
  automático 36
  componentes para lavado 39
  consumibles proporcionados por el usuario 39
  lavado manual 11, 39
lavado del instrumento 39
lavado posterior al experimento 36
Live Help 11, 49
llamada de bases 66
longitud de lectura 17-18

M

mantenimiento del instrumento
  consumibles 19
mensaje de error de RAID 59

N

nombre de avatar 16
nombre de usuario del sistema y contraseña 9
nombre de usuario y contraseña 9
nombre del instrumento, personalización 16
numeración de cámaras 71
numeración de carriles 70
numeración de placas 72
numeración de sectores 71

O

opción de carga avanzada 12, 16

P

pantalla Home 11
parámetros de configuración 14
parámetros del experimento
  editar parámetros 31
  modo BaseSpace 31
  modo independiente 32
pares de carriles 70
personalización 16
probabilidad de error 67
puntuaciones de calidad 67
puntuaciones Q 67
purgar consumibles 17

R

reactivos
  eliminación correcta 30
  en kit 6
reactivos usados
  contenedor lleno 52
  eliminación 28, 41
rehibridación de cebador 53
rehibridación, Lectura 1 53
RTA v2
  gestión de errores 64
RunInfo.xml 47, 68

S

secuenciación
  consumibles suministrados por el usuario 19
seguimiento de RFID 6
servicio de asistencia al cliente 79
servicio de copia de experimento 35

software
actualización automática 42
actualización manual 13, 42
análisis de imágenes, llamada de bases 11
configuración del instrumento 16
duración del experimento 17
inicialización 9
integrado en el instrumento 11
pantalla Home 11
parámetros de configuración 14
software de análisis en tiempo real 2, 11
diferencias de RTA v2 62
resultados 68
software de control 11
solución de errores
comprobación previa al experimento 50
solución de problemas
archivos específicos de experimento 47
comprobación del sistema 13, 56
contenedor de reactivos usados 52
criterios de medición de baja calidad 53
Live Help 49
opciones de contacto 46
superan el filtro (PF) 64

T

transferencia de datos
iconos de actividad 35
servicio de copia de experimento 35

U

ubicación de carpetas 32
ubicación de grupos
archivos 68
generación de plantillas 65
ubicación de la carpeta de resultados 15

V

Visor del análisis de secuenciación 22

Asistencia técnica

Si necesita asistencia técnica, póngase en contacto con el servicio de asistencia técnica de Illumina.

Tabla 3 Información de contacto general de Illumina

Sitio web	www.illumina.com
Correo electrónico	techsupport@illumina.com

Tabla 4 Números del Servicio de asistencia al cliente de Illumina

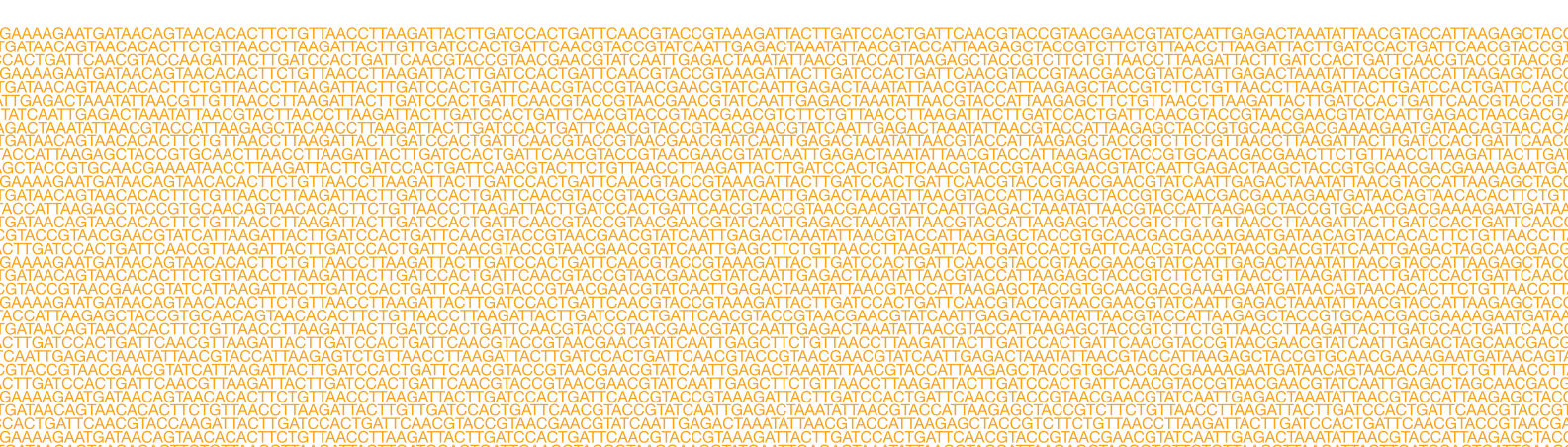
Zona	Número de contacto	Zona	Número de contacto
Norteamérica	1.800.809.4566	Irlanda	1.800.812949
Alemania	0800.180.8994	Italia	800.874909
Australia	1.800.775.688	Noruega	800.16836
Austria	0800.296575	Nueva Zelanda	0800.451.650
Bélgica	0800.81102	Países Bajos	0800.0223859
Dinamarca	80882346	Reino Unido	0800.917.0041
España	900.812168	Suecia	020790181
Finlandia	0800.918363	Suiza	0800.563118
Francia	0800.911850	Otros países	+44.1799.534000

Hojas de datos de seguridad

Las hojas de datos de seguridad están disponibles en el sitio web de Illumina en support.illumina.com/sds.html.

Documentación del producto

La documentación del producto en PDF está disponible para su descarga en el sitio web de Illumina. Vaya a support.illumina.com, seleccione un producto y, a continuación, haga clic en **Documentation & Literature** (Documentación y literatura).



Illumina
5200 Illumina Way
San Diego, California 92122 (EE. UU.)
+1 800 809 ILMN (4566)
+1 858 202 4566 (fuera de Norteamérica)
techsupport@illumina.com
www.illumina.com